



Aspects physiologiques et biochimiques de la tolérance à l'arsenic chez les plantes supérieures dans un contexte de phytostabilisation d'une friche industrielle

Annabelle Austruy

► To cite this version:

Annabelle Austruy. Aspects physiologiques et biochimiques de la tolérance à l'arsenic chez les plantes supérieures dans un contexte de phytostabilisation d'une friche industrielle. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22244 . tel-00745701

HAL Id: tel-00745701

<https://theses.hal.science/tel-00745701>

Submitted on 26 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° B.U. : 2244

Année 2012

**Ecole Doctorale Science de la Vie,
Santé, Agronomie, Environnement**

N° d'ordre : 580

Thèse de Doctorat

Présentée à l'Université Blaise Pascal

pour l'obtention du titre de

Docteur d'Université

Physiologie et Génétique Moléculaire

Soutenue le 14 juin 2012

AUSTRUY Annabelle

**Aspects physiologiques et biochimiques de la tolérance à
l'arsenic chez les plantes supérieures dans un contexte de
phytostabilisation d'une friche industrielle**

JURY

Président :	LEDOIGT Gérard, Professeur de l'Université Blaise Pascal, UMR PIAF
Directeur de thèse :	HITMI Adnane, Maître de Conférences de l'Université d'Auvergne, UMR PIAF
Rapporteurs:	DUMAT Camille, Professeur de l'INP Toulouse, ECOLAB LAFFRAY Daniel, Professeur de l'Université Paris XII, EPM MENCH Michel, Directeur de recherche, INRA Bordeaux
Examineur :	JOUSSEIN Emmanuel, Maître de Conférences de l'Université de Limoges, GRESE
Invité :	JARDIN Stéphane, Ingénieur de Recherche en valorisation, Auvergne Valorisation

INRA, UMR A 547 PIAF, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Résumé

Ce travail a pour objectif la mise en place d'un procédé de phytostabilisation sur un ancien site industriel, la Vieille Usine d'Auzon (43, France). La caractérisation pédochimique du site atelier a révélé une pollution polymétallique par l'As, Pb, Sb, Cd et Cu. L'As, de par sa concentration totale et sa biodisponibilité dans le sol, est considéré comme le polluant le plus présent et le plus toxique. L'étude floristique réalisée sur le site a relevé une flore métallicole dominée par des pseudométallophytes électives telles que *Agrostis capillaris*, *Equisetum arvense*, ou les Euphorbiacées. De manière générale, la majorité des espèces présentes sur la friche industrielle a accumulé de très faibles quantités de polluants (As, Pb) dans ces parties aériennes. Dans un deuxième temps, les travaux ont porté sur les effets induits par les ETM au niveau physiologique et biochimique chez des modèles végétaux, *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum*, *Vicia faba* et *Cannabis sativa*. Ces données ont mis en évidence la sensibilité de *V. faba* et la tolérance de *S. nigrum* à la pollution aux ETM, un maintien de l'activité physiologique mais un ralentissement de la croissance de *C. sativa* sur sol pollué et une tolérance adaptative d'*A. capillaris* à la pollution du sol. Par ailleurs, une culture en hydroponie de *S. nigrum* et *V. faba* en présence d'As inorganique, arsénite et arséniate, à différentes concentrations a permis de mettre en évidence deux effets de l'As. Celui-ci a provoqué une altération de la structure et du fonctionnement des PSII, plus sensibles à l'As(III), et, une inhibition de l'activité oxygénase et carboxylase de la Rubisco, cible privilégiée de l'As(V). Enfin, ces résultats ont été utilisés dans le cadre de l'expérimentation *in situ* pour la validation d'un procédé de phytostabilisation sur la friche industrielle d'Auzon. Les effets de la combinaison d'une association d'espèces prairiales et d'un amendement de grenaille de fer zérovalent ou/et de compost ont pu être caractérisés. L'ajout de grenaille de fer au sol complété par un apport de compost a accentué la réduction de la disponibilité de l'As et dans une moindre mesure de Sb. De plus, il a permis d'enrichir le sol en élément minéraux et organiques et a ainsi facilité l'implantation d'un couvert végétal constitué d'espèces végétales à phénotype d'exclusion. Cette expérience *in-situ* a donc permis de mettre en avant la faisabilité d'un procédé de phytostabilisation dans la dépollution et la revalorisation de sites industriels.

Mots clés : arsenic, photosynthèse, tolérance, phytostabilisation, biodisponibilité

Physiological and biochemical aspects of tolerance to arsenic in higher plants in a context of phytostabilization of industrial wasteland

Abstract

This work aims to the establishment of a phytostabilization process on an old industrial site, "La Vieille Usine" in Auzon (43, France). The pedochemical characterization revealed a polymetallic pollution by As, Pb, Sb, Cd, Cu. The As, by its total content and its bioavailability, is considered as the most concentrated and toxic. A floristic study noted a metalicolous flora dominated by elective pseudometallophyte species such as *Agrostis capillaris*, the dominant specie, *Equisetum arvense*, or Euphorbiaceae. Broadly speaking, the majority of species on the industrial site has accumulated very low amounts of pollutants (As, Pb) in these shoots. To better understand the trace element effects on different plants, *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum*, *Cannabis sativa* and *Vicia faba* were grown on the Auzon's soil under controlled conditions. These data highlighted (i) the sensitivity of *V. faba* and the tolerance of *S. nigrum* to trace element pollution; (ii) for *C. sativa*, the maintenance of its physiological activity but a slowdown of its growth; (iii) the adaptative tolerance of *A. capillaris* to soil pollution. In addition, a hydroponics culture of *S. nigrum* and *V. faba* in the presence of different concentrations and different oxidation degrees (arsenite and arsenate) of inorganic As allowed to identify two main effects of As at physiological and biochemical level. First, it alters the structure and function of PSII, which seems more sensitive to As(III), and, secondly, it inhibits the carboxylase and oxygenase activities of Rubisco, the main target of As(V). These data were then used to conduct an *in-situ* experiment based on a phytostabilization process on the industrial wasteland of Auzon. The effects of the combination of an grassland species association with a zerovalent iron shot and/or compost amendment were characterized. The addition of iron shot on the soil completed with compost decreased the available fraction of As and to a lesser extent Sb. Moreover, the amendments allowed to enrich the soil with mineral and organic elements and to facilitate the establishment of vegetal cover composed by tolerant plants with an exclusion phenotype. This *in-situ* experience enabled to highlight the feasibility of a phytostabilization method in the depollution of industrial sites as in their enhancement.

Key words: arsenic, photosynthesis, tolerance, phytostabilization, bioavailability

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury, les rapporteurs Mme Camille Dumat (Professeur de l'INP Toulouse, ECOLAB), Mr Daniel Laffray (Professeur de l'Université Paris XII, EPM) et Mr Michel Mench (Directeur de recherche, INRA Bordeaux) ainsi que les examinateurs et les membres invités Mr Gérard Ledoigt (Professeur de l'Université Blaise Pascal, INRA UMR 547), Mr Emmanuel Joussein (Maîtres de Conférences à l'Université de Limoges, GRESE) et Mr Stéphane Jardin (Ingénieur de recherche Auvergne Valorisation) pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie la Région Auvergne qui a participé au financement de ce travail par une bourse innovation et ainsi permis sa réalisation. Je tiens aussi à remercier toutes les personnes et services qui m'ont permis d'avoir accès au site industriel de la "Vieille Usine d'Auzon" et tout particulièrement Mr le Maire d'Auzon, Henri Doniol, ainsi que la secrétaire de Mairie pour leur disponibilité et la mise à disposition du site sans lequel ce travail n'aurait pu voir le jour.

Mes remerciements vont aussi à Mr Jean Marc Lavest, Directeur de l'IUT Clermont-Ferrand, pour m'avoir accueilli dans les locaux de l'IUT et m'avoir donné l'accès à l'ensemble des équipements de l'IUT Génie Biologique Antenne d'Aurillac. Mon recrutement sur un poste ATER au sein de l'IUT pendant ces deux dernières années m'a permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions, je vous en suis reconnaissante et vous en remercie.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Adnane Hitmi, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, qui m'a accueilli dans son équipe et suivi tout au long de mon travail de recherche. Nos échanges scientifiques, toujours productifs et quelque fois houleux m'ont très souvent guidée et permis d'avancer. Partager un bureau de 15 m² pendant 5 ans n'a pas toujours été dans le calme et la bonne humeur mais presque... Je te remercie de m'avoir accueilli et offert tous les moyens nécessaires pour réaliser ce projet.

Ce travail n'aurait pas eu la même consistance sans le soutien, l'aide et les nombreux conseils de Cécile Moussard, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, qui a toujours été présente dans les meilleurs moments comme dans les moins bons. Je te remercie, Cécile, pour ton investissement dans ce travail et pour tout ce que tu m'as apporté tant au niveau humain que professionnel. Je remercie également Philippe Vernay, doctorant et enseignant à

l'IUT d'Aurillac, qui en jonglant entre sa thèse, sa charge importante d'enseignement sans parler de ses projets personnels a toujours répondu présent lorsque j'ai fait appel à lui notamment lors de la mise en place des parcelles expérimentales sur le site industriel d'Auzon ou pour toutes questions relatives au domaine de la chimie. Je remercie également Valérie Polonais, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, pour son aide et ses corrections de mes écrits en anglais.

Je remercie très amicalement toutes les personnes qui ont fait un stage en lien avec mes travaux, soit par ordre d'apparition : Frédéric Langer, Aurélie Levêque, Stéphani Perea Velez, Si Li, Arthur Chaudière, Quentin Sicard et Marie Villain. Je n'aurais jamais pu réaliser tout ceci sans votre concours.

Je remercie l'ensemble du laboratoire ERTAC, aujourd'hui intégré à l'UMR INRA PIAF 547, Gérard Ledoigt, Professeur de l'Université Blaise Pascal, Pascal Goupil, Maître de Conférences, Yollande Bargibant, en charge du secrétariat, Dalila Sougir et Chaima Sta, doctorantes au cours de ma thèse, ainsi que Céline, technicienne du laboratoire, pour leur encadrement et leur aide précieuse dans les travaux de biologie moléculaire que j'ai mené dans leur structure. Je remercie également Jean-Louis Julien, Professeur de l'Université Blaise Pascal, qui m'a permis de terminer les travaux en cours au sein de l'UMR INRA PIAF 547 suite à l'intégration de l'ERTAC dans cette structure en 2010.

Je tiens aussi à remercier Michel Baudu, Professeur de l'Université de Limoges, pour son accueil dans le laboratoire GRESE. J'apporte tout particulièrement mes remerciements à Emmanuel Joussein et Maryline Soubrand, tous deux Maîtres de Conférences à l'Université de Limoges, pour leur suivi et leur disponibilité tout au long de mes séjours à Limoges. Un grand merci à Nastasia Wanat, doctorante au laboratoire GRESE, mon acolyte tout au long de ce périple, avec qui j'ai pu partager mes peines, mes joies et tout type d'émotions au cours de cette thèse. Notre persévérance a payé ! Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire GRESE, chercheurs, techniciens et doctorants, que j'ai eu l'occasion de croiser au cours de mes nombreux passages à Limoges et plus particulièrement Raad Al Shukry, ingénieur au laboratoire, pour son aide précieuse lors des dosages de l'As par SAA.

Merci également à l'équipe de recherche du laboratoire SPIN GENERIC de l'Ecole des Mines de St-Etienne, et plus particulièrement à Jean-Luc Bouchardon, Maître Assistant au laboratoire SPIN GENERIC, pour son accueil et sa gentillesse et Geoffrey Lespagnol, post-doctorant au laboratoire SPIN GENERIC, pour le temps précieux qu'il m'a accordé et ses conseils avisés lors de mon passage dans ce laboratoire.

Pour boucler la boucle des nombreuses équipes qui m'ont accueillie ou qui ont collaboré à ces travaux de recherche, je remercie Valérie Laperche, Chef de projet au BRGM d'Orléans, pour sa disponibilité et sa contribution sur la caractérisation de la pollution du site industriel d'Auzon. Je remercie également Marina Le Guédard, Ingénieur de Recherche au laboratoire de Biogenèse Membranaire, pour avoir consacré de son temps à cette étude avec la détermination de la composition en lipides d'échantillons de feuilles. Mes remerciements vont aussi à Mr Mhammed Benbakkar, Ingénieur d'Etudes au laboratoire Magma et Volcans, pour sa collaboration dans ce travail et qui a notamment réalisé de nombreux dosages d'ETM sur les échantillons de sols ou de végétaux. Un remerciement spécial pour Michel Mench pour m'avoir chaperonné lors des trois congrès internationaux auxquels j'ai participé.

Pour finir, je tiens à remercier tout particulièrement l'ensemble des collègues de l'IUT d'Aurillac pour leur accueil chaleureux, leur soutien, leur aide et leur disponibilité pour la mise en place ou le suivi des expérimentations et surtout pour leur convivialité et leur bonne humeur indispensable au bon fonctionnement d'une équipe. J'ai été ravie de partager ces quelques années avec vous. C'était une expérience très enrichissante tant au niveau professionnelle que humaine, les longues journées de travail, mes premiers pas d'enseignante, la bonne entente au travail ainsi que la qualité de vie de cette belle région, j'ai passé de superbes années à l'IUT d'Aurillac et dans le Cantal ! Une pensée spéciale à mes collègues des pauses café, Roland, Solange, Stéphane, Olivier, Marylise, Michel, ou Maryse pour ne citer qu'eux, pour leur bonne humeur, nos débats diverses et variés à la pause du midi, et pour avoir supporté mes humeurs tout au long de ces années, "Tête de nœuds" vous remercie ! Merci également à Guy Febvre, Chef du Département de l'IUT Génie Biologique et Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, et Philippe Veisseire, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, pour avoir, avec l'appui de mon directeur Adnane Hitmi, défendu mon dossier lors de mon recrutement à l'IUT sur un poste ATER me permettant de terminer mon travail dans les meilleures conditions.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui m'auront soutenue tous les jours et sans qui ces années m'auraient parues très longues. En premier lieu, je remercie l'ensemble de mes colocs, ma deuxième famille à Aurillac, Olivier, Maud, Laura, JB, Stéphanie, Bertrand, Stéphanie, Fanny, Vivi, Anthony et tous les gens de passage à la maison pour une plus ou moins longue durée. Ils ont partagé mon quotidien et ils ont toujours su me faire décompresser une fois rentrer à la maison, à refaire le monde autour de bons repas. Sans oublier nos weekends de virées en randonnée dans les monts cantaliens, en raquette, en ski, à pied ou en canoë, tous les

moyens étaient bons pour profiter de cette belle région. Merci à vous! Merci également à Elmer et Christian qui pourraient presque faire partis des colocs, vu le nombre de soirées passées ensemble à jouer à la belote avec les copains de Canteloube. Un clin d'œil au club de hand de St Mamet, dirigeants, entraineurs, joueurs que j'ai croisé au cours de ces 5 ans au club, et tout particulièrement à toutes les joueuses avec qui j'ai partagé victoires et défaites les weekends de match en terre auvergnate et jusqu'aux portes de la méditerranée et du midi certaines années. Je remercie tout particulièrement mes amis toulousains, Edwina, Leena, Sarah, Léo, Ibrahima, Nadia, Julia, Nico, Samir et tous ceux qui se reconnaîtront, qui ont su à chacun de mes séjours à Toulouse me rappeler aux bons souvenirs de la ville rose, de ses bars animés à ses rues enchantées, en passant par les pelouses de bord de Garonne, le tout réchauffé par le soleil du midi. Un merci spécial à Edwina, ma pote de toujours, qui est venue me rendre visite à Aurillac de nombreuses fois et qui m'a soutenue tout au long de ce travail. Une pensée pour mon amie d'enfance, Oriane, avec qui j'ai grandi et connu beaucoup d'aventures tout au long de ces années et qui, pour elle aussi aujourd'hui, est un nouveau départ. Enfin, mes remerciements vont également à mes compagnons de route à la fac, Rémy, Morgane, Marine, Nico, Léo, Blaise, Julie, Julien et en incluant Clément éparpillés au quatre coin de France, DOM y compris, voir en Belgique et avec qui les vacances sont toujours réussies !

Je terminerais par les remerciements les plus importants... Mes parents que j'adore, ma sœur, Emeline, mon frère, Jean-Christophe, et sans oublier ma belle sœur, Lise, qui m'ont soutenue, écoutée, réconfortée et surtout m'ont aidée à relativiser. Votre soutien a été essentiel tout au long de ce parcours, merci à vous, je vous adore. Et j'en profite pour remercier l'ensemble de ma grande famille source de sérénité et d'équilibre, les journées et repas partagés dans l'Aveyron comme à Agen sont toujours d'agréables moments. Un merci tout particulier à ma cousine, Stéphanie, qui par ses destinations exotiques pour trouver du travail est à l'origine de presque tous mes voyages...

Table des matières

Introduction générale.....	1
Première partie : Référence bibliographique.....	7
Chapitre I : Problématique de la pollution des sols par les éléments traces métalliques et métalloïdes	9
1. Description et intérêt d'un sol	9
1.1. Définition et fonctions principales d'un sol	9
1.2. Formation d'un sol	10
1.3. Processus de dégradation des sols	12
2. Contamination par les éléments traces métalliques ou métalloïdes.....	13
2.1. Définition des Eléments Traces Métalliques (ETM)	13
2.2. Sources naturelles des ETM	13
2.3. Apport d'origine anthropiques des ETM	15
2.4. Localisation des ETM dans les sols et spéciation chimique.....	18
3. L'état des sols en Europe et en France	25
3.1. En France.....	25
3.2. En Europe	27
Chapitre II : L'arsenic dans le sol.....	28
1. Généralités	28
2. Origine et localisation.....	29
2.1. Origine naturelle de l'arsenic	29
2.2. Sources anthropiques de l'arsenic.....	31
3. Toxicité de l'arsenic	32
4. Forme et mobilité de l'arsenic dans le sol.....	35
4.1. Les formes inorganiques.....	35
4.2. Les formes organiques.....	38
Chapitre III : L'arsenic et les plantes	39
1. Transfert de l'arsenic du sol vers les plantes.....	39
1.1. Disponibilité de l'arsenic dans le sol	40
1.2. Absorption racinaire de l'arsenic	43
1.3. Translocation, détoxification et stockage de l'arsenic	45
2. Phytotoxicité de l'arsenic	49
2.1. Effet de l'arsenic sur le développement des plantes	50
2.2. Toxicité de l'arsenic au niveau physiologique et biochimique	51

3. Tolérance de l'arsenic chez les plantes	55
3.1. Le stress oxydatif.....	55
3.2. Les systèmes antioxydants de protection.....	58
3.3. Les cibles des ERO.....	59
Chapitre IV : La phytoremédiation : un procédé biologique de dépollution des sols ..	60
1. Généralités	61
2. Les différentes techniques de phytoremédiation	61
3. Les espèces végétales métallobytopes	64
Deuxième partie : Matériels et méthodes.....	71
Chapitre I : Présentation et localisation du site d'étude	73
1. Localisation géographique.....	73
2. Historique du site.....	74
3. Caractéristiques hydrogéologiques du site atelier	75
4. Etude floristique du site atelier	76
Chapitre II : Analyses des échantillons de sol	78
1. Protocole d'échantillonnage.....	78
2. Analyses des paramètres physico-chimiques du sol.....	80
2.1. Mesure du pH.....	80
2.2. Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC).....	80
2.3. Granulométrie.....	81
2.4. Teneur en carbone organique	81
2.5. Teneur en azote total	81
2.6. Teneur en phosphore soluble.....	82
Chapitre III : Matériel végétal et conditions de culture	82
1. Description des espèces végétales sélectionnées.....	82
1.1. <i>Agrostis capillaris</i> L.....	82
1.2. <i>Solanum nigrum</i> L.....	83
1.3. <i>Vicia faba</i> L.....	84
1.4. <i>Cannabis sativa</i> L.....	85
2. Germination des graines	86
3. Culture des plantes sur sol	87
4. Culture des plantes en hydroponie totale.....	88
5. Récolte et conditionnement du matériel	89

Chapitre IV : Dosage des teneurs totales et disponibles en ETM dans les échantillons de sols et de végétaux	90
1. Préparation du matériel et conditions d'expérience	90
2. Echantillons de sol.....	90
2.1. Minéralisation à l'eau régale pour le dosage des teneurs totales	90
2.2. Extraction des ETM au CaCl_2 à $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$	91
2.3. Extractions séquentielles sélectives de l'arsenic.....	91
3. Echantillons de végétaux	93
4. Méthodes de dosage des ETM.....	94
4.1. Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA)	94
4.2. Spectrométrie d'Emission Atomique (AES).....	95
4.3. Spectrométrie de fluorescence X.....	96
Chapitre V : Analyses physiologiques et biochimiques sur les plantes	97
1. Mesure de la biomasse végétale et de la teneur en eau	97
2. Dosage des teneurs en pigments photorécepteurs	97
3. Mesure des échanges gazeux photosynthétiques.....	98
3.1. Paramètres mesurés	98
3.2. Principe.....	98
3.3. Protocole de saturation lumineuse et en CO_2 de la photosynthèse	99
4. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne	100
4.1. Modélisation de la fluorescence de la chlorophylle a.....	100
4.2. Cinétique de Kautsky	101
4.3. Méthode des flashes saturants	101
4.4. Mesures des paramètres de la fluorescence de la chlorophylle a	103
5. Mesure de la composition en acide gras des feuilles et produits de dégradation	104
5.1. Analyse de la composition en acide gras de feuilles	104
5.2. Mesure de la peroxydation des lipides membranaires.....	105
Chapitre VI : Développement d'un procédé de phytostabilisation in-situ	106
1. Principes et élaboration du procédé.....	106
2. Préparation du sol et amendements	107
3. Couvert végétal et sélection des espèces	109
3.1. Association de plantes prairiales	109
3.2. Monoculture de chanvre	110

4. Paramètres suivis	110
Chapitre VII : Analyses statistiques des données	111
1. Test U de Mann et Whitney.....	111
2. Analyse de Variance (ANOVA).....	111
3. Analyse en Composantes Principales (ACP).....	111
Troisième partie : Résultats - Discussion.....	113
Chapitre I : Description des sols d'études	115
1. Caractérisation des paramètres physico-chimiques des sols échantillonnés	115
2. Evaluation de la pollution du sol aux ETM et métalloïdes.....	117
3. Répartition et phases porteuses de l'As dans le sol.....	120
4. Caractérisation floristique des sites d'études	121
5. Phytoaccumulation de l'As et du Pb par la végétation.....	125
6. Discussion.....	126
6.1. Evaluation et caractérisation de la pollution du site d'Auzon.....	126
6.2. Etude de la flore métallicole.....	128
Chapitre II : Culture sur sol de 4 espèces végétales en conditions contrôlées	132
1. Evaluation de la toxicité des ETM chez 4 espèces végétales	133
1.1. Effet des ETM sur le développement des plantes.....	133
1.2. Activités physiologiques et biochimiques des plantes	136
2. Absorption et stockage de l'arsenic et évolution de la disponibilité de cet élément dans le sol rhizosphérique.....	141
2.1. Absorption et stockage de l'As	142
2.2. Influence de la culture de plantes sur la disponibilité de l'arsenic dans le sol rhizosphérique	144
3. Discussion.....	145
3.1. Impact physiologique de la pollution aux ETM sur les différentes espèces végétales.....	145
3.2. Transfert et stockage de l'As.....	148
3.3. Influence des cultures sur la distribution de l'As dans le sol	150
Chapitre III : Expérimentation in-situ d'un procédé de phytostabilisation.....	153
1. Conditions climatiques pendant l'expérimentation.....	156
2. Propriétés physico-chimiques des sols	157
2.1. Evolution du pH	158
2.2. Evolution de la CEC.....	158

2.3. Teneur en phosphore dans le sol	159
2.4. Teneur en fer dans le sol.....	160
3. Evaluation d'un point de vue qualitatif et quantitatif du couvert végétal	161
3.1. Etude de la diversité végétale.....	161
3.2. Croissance et développement des plantes.....	163
4. Comportement des ETM dans le sol.....	166
4.1. Etude des teneurs totales et disponibles en ETM dans les différentes parcelles	166
4.2. Influence du couvert végétal et des amendements sur les teneurs totales et la disponibilité des ETM dans le sol.....	168
5. Absorption des éléments métalliques et minéraux par les plantes	169
5.1. Transfert et stockage des ETM dans les plantes.....	169
5.2. Teneur en phosphore et en fer dans les plantes	175
6. Discussion.....	177
6.1. Développement du couvert végétal	177
6.2. Influence d'un procédé de phytostabilisation sur les teneurs en éléments traces et leur disponibilité dans le sol	179
Chapitre IV : Caractérisation des mécanismes de tolérance et de toxicité de l'arsenic chez deux espèces végétales <i>Solanum nigrum</i> et <i>Vicia faba</i>	187
1. Absorption et stockage de l'arsenic par les plantes.....	187
2. Evaluation de la toxicité de l'arsenic vis-à-vis des deux espèces végétales	190
2.1. Impact de l'arsenic sur la croissance et le développement des plantes	190
2.2. Effet de l'arsenic sur l'activité photosynthétique de ces espèces	192
3. Impact de l'As sur les lipides membranaires	206
3.1. Composition en acide gras des feuilles	206
3.2. Mesure de la peroxydation des lipides membranaires.....	207
4. Discussion.....	209
4.1. Absorption et stockage de l'arsenic dans les plantes	209
4.2. Toxicité de l'As et impact sur l'activité photosynthétique	210
4.3. Impact de l'As sur les lipides membranaires	215
4.4. Tolérance et impact de l'arsenic sur l'activité photosynthétique et le développement des plantes.....	216
Quatrième partie : Discussion générale.....	221

Chapitre I : Les impacts de la contamination des sols par les éléments traces métalliques sur les communautés végétales et risque de transfert dans la chaîne trophique	223
Chapitre II : Effets physiologiques et biochimiques de l'arsenic et dans un cadre plus général des éléments traces métalliques sur les plantes.....	225
Chapitre III : Evaluation d'un procédé de phytostabilisation aidée sur une friche industrielle présentant une pollution polymétallique.....	227
Conclusion perspectives.....	231
Références bibliographiques.....	237
Annexes.....	275

Table des Figures

PREMIERE PARTIE

<u>Figure I-1</u> : Organisation du sol et principales relations avec les autres compartiments.....	10
<u>Figure I-2</u> : Mécanismes de base de la pédogénèse.....	11
<u>Figure I-3</u> : Cartes des sols de France.....	11
<u>Figure I-4</u> : Les diverses sources de pollutions des sols et leurs conséquences.....	15
<u>Figure I-5</u> : Deux démarches de gestion possibles, IEM ou plan de gestion.....	17
<u>Figure I.6</u> : Phases porteuses des ETM dans les sols et influence sur leur mobilité.....	18
<u>Figure I-7</u> : Les sites et sols pollués en 2009 (sites sur lesquels l'Etat a entrepris des actions au 9 juillet 2009).....	26
<u>Figure I.8</u> : Nature des polluants rencontrés sur les sites pollués français.....	26
<u>Figure I-9</u> : Nombre de sites et sols pollués par région en 2009.....	27
<u>Figure I-10</u> : Inventaire des sites contaminés en Europe.....	28
<u>Figure I.11</u> : Diagramme Eh-pH du système As-O-H (10^{-10} mol.kg ⁻¹ d'As et conditions standards de température et pression).....	36
<u>Figure I.12</u> : Schéma représentant les fractions bioaccessibles et biodisponibles du contaminant dans un sol.....	40
<u>Figure I.13</u> : Répartition d'un élément trace dans les différentes phases du sol à un instant t.	41
<u>Figure I.14</u> : Cycle biogéochimique de l'As.....	42
<u>Figure I.15</u> : Biosynthèse des PC chez les plantes supérieures.....	47
<u>Figure I.16</u> : Schéma des mécanismes possibles de l'absorption, de la détoxification et du stockage de l'As dans les racines de plantes.....	48
<u>Figure I.17</u> : Utilisation de l'énergie lumineuse incidente reçue par les PSII.....	53
<u>Figure I.18</u> : Cibles des éléments traces métalliques et métalloïdes dans le cycle de Calvin..	54
<u>Figure I.19</u> : Principaux dommages cellulaires induits par les espèces réactives de l'oxygène et provoqués sur les lipides, les protéines et l'ADN.....	57
<u>Figure I.20</u> : Formation et détoxification des radicaux libres lors d'un stress As.....	58
<u>Figure I.21</u> : Les différents procédés de phytoremédiation et le rôle des plantes.....	61
<u>Figure I.22</u> : Catégories des plantes présentes sur des sols contaminés par des ETM.....	65

DEUXIEME PARTIE

<u>Figure II.1</u> : Carte IGN 2633 O St Germain-Lembron et carte de l'ancienne usine d'Auzon..	73
<u>Figure II.2</u> : Localisation de la parcelle 227, zone d'étude située au sud-ouest du site pollué, et de la parcelle témoin installée sur la plaine alluviale de l'Allier.....	74
<u>Figure II.3</u> : Représentation du quadrillage du site en placette de 3 m ² pour l'étude floristique réalisée sur le site d'Auzon par la méthode de Braun – Blanquet.....	77
<u>Figure II.4</u> : Localisation des zones de prélèvements sur le site d'Auzon pollué (AP, en rouge), et sur le site d'Auzon témoin (AT, en jaune), les sigles noir sur le site industriel représente les zones d'études du BRGM.....	79
<u>Figure II.5</u> : Culture de <i>Vicia faba</i> en hydroponie totale en condition contrôlée.....	88
<u>Figure II.6</u> : Variation de la fluorescence modulée en fonction du temps.....	102
<u>Figure II.7</u> : Disposition des parcelles.....	107
<u>Figure II.8</u> : Préparation des parcelles au printemps 2010 avant la mise en culture.....	108

TROISIEME PARTIE

<u>Figure III.1</u> : Positionnement des sols AT et AP dans le triangle des textures (USDA).....	116
<u>Figure III.2</u> : Evolution, en fonction de la profondeur, des facteurs d'enrichissement de l'As, du Cu, du Pb, du Cd et de l'Sb sur le site de la Vieille Usine d'Auzon (AP), calculés en utilisant Al comme élément de référence.....	119
<u>Figure III.3</u> : Teneurs en As dans différents horizons de sol d'Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP).....	120
<u>Figure III.4</u> : Distribution de l'As dans le sol AT et AP. R ₁ : fraction échangeable et acido-soluble, R ₂ : fraction réductible, As associé au Fe et au Mn, R ₃ : fraction oxydable et R ₄ : fraction résiduelle.....	121
<u>Figure III.5</u> : Proportion des familles de plantes pour chaque site, le site témoin (AT) (a) et le site pollué (AP) (b).....	125
<u>Figure III.6</u> : Concentrations en Pb (a) et en As (b) dans les feuilles et les racines d'espèces dominantes prélevées dans la zone polluée (AP).....	126
<u>Figure III.7</u> : Biomasse aérienne (a) et racinaire (b) des différentes espèces végétales <i>S. nigrum</i> , <i>A. capillaris</i> , <i>V. faba</i> et <i>C. sativa</i> cultivées sur différents types de sol, le terreau (T, condition de référence), Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP).....	133

<u>Figure III.8</u> : Plants de <i>S. nigrum</i> (a), <i>A. capillaris</i> (b), <i>V. faba</i> (c) et <i>C. sativa</i> (d) après un mois de culture sur les différents types de sol, Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP).....	134
<u>Figure III.9</u> : Teneur en eau (TE) dans les feuilles (a) et les racines (b) des 4 espèces végétales en fonction du type de sol, le Terreau (T), Auzon Témoin (AT) ou Auzon Pollué (AP).....	135
<u>Figure III.10</u> : Mesure des échanges gazeux au niveau des feuilles pour les 4 espèces végétales cultivées sur les différents types de sol, Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP), (a) photosynthèse nette (Pn), (b) conductance stomatique (gs), (c) concentration intercellulaire en CO ₂ (Ci), (d) transpiration (Tr).....	137
<u>Figure III.11</u> : Teneurs en chlorophylles dans les feuilles de <i>S. nigrum</i> , <i>A. capillaris</i> , <i>V. faba</i> et <i>C. sativa</i> cultivées sur les 3 sols, le Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP), (a) teneur en chlorophylles <i>a</i> et (b) teneur en chlorophylles <i>b</i>	139
<u>Figure III.12</u> : Paramètres de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> mesurés chez 4 espèces végétales, <i>S. nigrum</i> , <i>A. capillaris</i> , <i>V. faba</i> et <i>C. sativa</i> , cultivées sur 3 types de sol, Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP), (a) efficacité photochimique maximale des PSII (Fv/Fm), (b) rendement de l'efficacité photochimique du PSII (ΦPSII).....	141
<u>Figure III.13</u> : Teneur en As (mg.kg ⁻¹ MS) dans les feuilles et les racines de <i>S. nigrum</i> , <i>A. capillaris</i> , <i>V. faba</i> et <i>C. sativa</i> cultivées sur les sols AT (a) et AP (b).....	142
<u>Figure III.14</u> : Facteurs de bioaccumulation (FB) (a) et de translocation (TF) (b) de l'As chez <i>S. nigrum</i> , <i>A. capillaris</i> , <i>V. faba</i> et <i>C. sativa</i> cultivées sur le sol Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP).....	143
<u>Figure III.15</u> : Pourcentage d'As dans les différentes fractions du sol d'Auzon Témoin (AT) et (a) et Pollué (AP) (b) avant et après la culture de <i>A. capillaris</i> , <i>S. nigrum</i> et <i>V.faba</i> . R ₁ : fraction échangeable et acido-soluble de l'As, R ₂ : As associé au Fe et Mn, R ₃ : fraction oxydable de l'As et R ₄ : fraction résiduelle de l'As.....	145
<u>Figure III.16</u> : Calcul des stocks en As dans les tissus des plantes après leur culture sur le sol Auzon Témoin (AT) (a) et Pollué (AP) (b).....	150
<u>Figure III.17</u> : Fraction R ₁ de l'As (%) avant culture (AC) et après la culture des 3 espèces végétales, <i>A. capillaris</i> , <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> sur le sol AT (a) et AP (b).....	150
<u>Figure III.18</u> : Régressions linéaires entre la quantité d'As contenu dans la plante et les teneurs de la fraction échangeable et acido-soluble de l'As pour (a) <i>S. nigrum</i> , (b) <i>A. capillaris</i> et (c) <i>V. faba</i>	151

<u>Figure III.19</u> : Photo des parcelles de chanvre cultivé après deux mois de culture, à gauche : parcelle de chanvre sur le site pollué (AP) avec apport de NPK et de grenaille de fer ; à droite : parcelle de chanvre sur le site de référence (AT).....	154
<u>Figure III.20</u> : Diagramme ombrothermique de 2010 réalisé à partir des données météorologiques de la station de Fontannes.....	156
<u>Figure III.21</u> : Diagramme climatique précisant les données quotidiennes de précipitation, évapotranspiration (ETP) et température pour l'ensemble de la période de l'expérimentation <i>in-situ</i> (de juin à octobre 2010). Les flèches noires correspondent aux apports en eau effectués sur l'ensemble des parcelles.....	157
<u>Figure III.22</u> : Teneur en phosphore soluble (mg.kg^{-1}) dans le sol en fonction des différentes conditions de cultures.....	159
<u>Figure III.23</u> : Teneur totale en fer (g.kg^{-1}) pour les différentes conditions de culture.....	160
<u>Figure III.24</u> : Biomasse aérienne (BA) fraîche mesurée après 3 mois de culture pour chaque condition.....	164
<u>Figure III.25</u> : Photos des parcelles au 10 août 2011, (a) parcelles AT AV, (b) parcelles AP AV, (c) parcelles AP AV _(Fe) , (d) parcelles AP AV _(MO) , (e) parcelles AP VN, (f) parcelles AP AV _(Fe+MO)	165
<u>Figure III.26</u> : Réduction des fractions biodisponibles des ETM (%) suite à la culture des plantes pour les différentes conditions.....	168
<u>Figure III.27</u> : Teneurs en As en mg.kg^{-1} de MS dans les parties aériennes et racinaires de la végétation en fonction des conditions de cultures.....	169
<u>Figure III.28</u> : Teneurs en Pb en mg.kg^{-1} de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures.....	170
<u>Figure III.29</u> : Teneurs en Sb en mg.kg^{-1} de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures.....	171
<u>Figure III.30</u> : Teneurs en Cd en mg.kg^{-1} de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures.....	172
<u>Figure III.31</u> : Teneurs en Cu en mg.kg^{-1} de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures.....	173
<u>Figure III.32</u> : Facteurs de Translocation (FT) entre les feuilles et les racines des différents ETM calculés en fonction des conditions de culture.....	174
<u>Figure III.33</u> : Facteurs de Bioaccumulation (FB) représentant le rapport entre les teneurs dans la plante et les teneurs totales dans le sol des différents ETM calculés en fonction des conditions de culture.....	175

<u>Figure III.34</u> : Teneurs en Fe dans les feuilles et les racines des plantes pour les différentes conditions de culture.....	176
<u>Figure III.35</u> : Teneurs en phosphore dans les feuilles et les racines de la végétation pour les différentes conditions de culture.....	177
<u>Figure III.36</u> : Représentation de l'influence des amendements et du développement de la biomasse aérienne (BF) sur la mobilité des métaux. ACP réalisée en prenant en compte les différentes conditions expérimentales sur sol pollué (n = 9 pour chaque condition), MO = Matière organique.....	180
<u>Figure III.37</u> : Régression linéaire entre la réduction de l'As disponible et les teneurs en fer dans le sol.....	181
<u>Figure III.38</u> : Représentation de l'influence des amendements et du développement de la biomasse aérienne (BF) sur le transfert des ETM vers la végétation. ACP réalisée en prenant en compte les différentes conditions expérimentales sur sol pollué (n = 9 pour chaque condition), MO = Matière organique.....	185
<u>Figure III.39</u> : Régression linéaire entre les teneurs en As dans la plante et les teneurs en phosphore dans le sol à partir des observations de chaque condition.....	186
<u>Figure III.40</u> : Teneurs en As dans les feuilles (a,b) et les racines (c,d) de <i>V. faba</i> et <i>S. nigrum</i> après 14 jours de culture en solution hydroponique en présence d'As(III) ou d'As(V).....	188
<u>Figure III.41</u> : Facteur de Translocation (FT) de l'As entre les racines et les feuilles des deux espèces végétales, <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> en présence (a) d'As(III) ou (b) d'As(V).....	189
<u>Figure III.42</u> : Biomasse aérienne et racinaire de <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> cultivées en solution hydroponique enrichie en As(III) et As(V), (a) Biomasse aérienne stress As(V), (b) Biomasse racinaire stress As(V), (c) Biomasse aérienne stress As(III), (d) Biomasse racinaire stress As(III).....	191
<u>Figure III.43</u> : Teneurs en chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> (graphe a et b), et en caroténoïdes (c) chez <i>V. faba</i> et <i>S. nigrum</i> cultivées en solution hydroponique enrichie en As inorganique.....	193
<u>Figure III.44</u> : Evolution du rapport Chl <i>a/b</i> et Chl tot/Car chez <i>V. faba</i> et <i>S. nigrum</i> cultivées en solution hydroponique enrichie en As inorganique.....	194
<u>Figure III.45</u> : Paramètres de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> mesurés chez <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> cultivées en solution hydroponique enrichie en AsIII et AsV. Représentation de la fluorescence minimale à l'obscurité (F_0 , a), de la fluorescence maximale à l'obscurité (F_m , b), de l'efficacité photochimique maximale des PSII (F_v/F_m , c) et du rendement de l'efficacité photochimique du PSII (Φ_{PSII} , d).....	196

<u>Figure III.46</u> : Mesure des échanges gazeux au niveau des feuilles pour les 2 espèces végétales cultivées en solution hydroponique enrichie en As inorganique, (a) photosynthèse nette (Pn), (b) conductance stomatique (gs), (c) concentration intercellulaire en CO ₂ (Ci), (d) transpiration (Tr).....	198
<u>Figure III.47</u> : Courbes de saturation de la photosynthèse de plants de <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> en fonction de la densité du flux de photons (de 0 à 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) après 14 jours de stress As. La teneur en CO ₂ est maintenue à 360 ppm et la température à 20 °C.....	200
<u>Figure III.48</u> : Courbe de saturation en CO ₂ , intensité lumineuse fixée à 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Evolution du taux de photosynthèse nette (Pn) de plants de <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> en fonction de la concentration externe en CO ₂ après 14 jours de stress As.....	203
<u>Figure III.49</u> : Valeurs moyennes du biomarqueur lipidique (rapport 18:3/(18:0+18:1+18:2)) dans les feuilles de <i>V. faba</i> et <i>S. nigrum</i> en fonction de la forme et de la concentration en As inorganique.....	206
<u>Figure III.50</u> : Mesure des teneurs en TBARS dans les feuilles de <i>V. faba</i> et <i>S. nigrum</i> cultivées en solution hydroponique enrichie en As(III) ou en As(V).....	208
<u>Figure III.51</u> : Représentation du rendement quantique de la fixation du CO ₂ (Φ_{CO_2} , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en fonction des teneurs en chlorophylles totales dans les feuilles.....	212
<u>Figure III.52</u> : Indices de tolérance de <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> calculés à partir de la longueur de la tige et en fonction de la forme et de la teneur de l'As dans la solution hydroponique après 14 jours de culture.....	218

Table des Tableaux

PREMIERE PARTIE

<u>Tableau I-1</u> : Gammes de valeurs ordinaires et d'anomalies naturelles de certains ETM dans divers horizons de sols, pas seulement les horizons de surface labourés. Les teneurs sont exprimées en mg.kg^{-1} de "terre fine" ($< 2 \text{ mm}$).....	14
<u>Tableau I-2</u> : Valeurs guides (VDSS et VCI) en matière de pollution des sols en mg.kg^{-1} de sol sec.....	16
<u>Tableau I-3</u> : Forme chimique dans les sols de différents ETM, distinction entre forme adsorbée et dissoute, et composant du sol principalement associé.....	22
<u>Tableau I-4</u> : Effets du pH et du potentiel redox sur la mobilité des ETM du sol.....	25
<u>Tableau I.5</u> : Propriétés physico-chimiques de l'élément arsenic.....	29
<u>Tableau I.6</u> : Principaux minéraux arséniés dans l'environnement.....	30
<u>Tableau I.7</u> : Principaux radicaux libres (ERO) produits lors d'un stress oxydatif chez les plantes (*R : substrat organique).....	56
<u>Tableau I.8</u> : Nombre d'espèces hyperaccumulatrices connues pour différents métaux et métalloïdes et familles les plus représentées.....	68

DEUXIEME PARTIE

<u>Tableau II.1</u> : Présentation de l'Agrostide commune, <i>Agrostis capillaris</i> L.....	83
<u>Tableau II.2</u> : Présentation de la Morelle noire, <i>Solanum nigrum</i> L.....	84
<u>Tableau II.3</u> : Présentation de la Fèverolle, <i>Vicia faba</i> L.....	85
<u>Tableau II.4</u> : Présentation du Chanvre cultivé, <i>Cannabis sativa</i> L.....	86
<u>Tableau II.5</u> : Concentrations en As(III) et en As(V) dans la solution nutritive pendant la période de stress.....	89
<u>Tableau II.6</u> : Protocoles des extractions séquentielles accélérées par ultrasons.....	92
<u>Tableau II.7</u> : Limites de détection du spectromètre portable de fluorescence X pour les différents ETM étudiés et le Fe (mg.kg^{-1}).....	96
<u>Tableau II.8</u> : Présentation des espèces sélectionnées pour l'étude par famille avec leur proportion dans l'association végétale.....	109

TROISIEME PARTIE

<u>Tableau III.1</u> : Paramètres physico-chimiques des différents types de sols étudiés.....	115
<u>Tableau III.2</u> : Répartition granulométrique et état hydrique des sols AT et AP.....	117
<u>Tableau III.3</u> : Teneurs totales en ETM dans les sols, le terreau, les sols AT et AP et Valeur de Constat d'Impact zone sensible (VCI).....	118
<u>Tableau III.4</u> : Caractéristiques des communautés végétales de chaque site témoin (AT) et pollué (AP).....	122
<u>Tableau III.5</u> : Relevé floristique de la végétation du site témoin (AT) et de la friche industrielle polluée (AP).....	123
<u>Tableau III.6</u> : Indice de Shannon (H') et d'Equitabilité (E) déterminés sur chaque site, Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP).....	129
<u>Tableau III.7</u> : Facteurs de bioaccumulation (FB) et de translocation (FT) calculés pour les différentes espèces prélevées sur le site d'étude.....	130
<u>Tableau III.8</u> : Impact de la pollution des sols en ETM sur les paramètres physiologiques de <i>S. nigrum</i> , <i>A. capillaris</i> , <i>V. faba</i> , et <i>C. sativa</i> , résultats du test ANOVA avec les différences significatives (n = 8, *, **, ***, F-test significatif à $P \leq 0,05$, 0,01 et 0,001, respectivement) et non significatives (NS) par rapport aux conditions contrôles.....	147
<u>Tableau III.9</u> : Composition floristique de l'Association Végétale (AV) introduite sur la friche industrielle.....	155
<u>Tableau III.10</u> : Présentation des abréviations des différentes conditions testées dans ce travail.....	156
<u>Tableau III.11</u> : Valeur du pH avant et après culture pour les différentes conditions.....	158
<u>Tableau III.12</u> : Valeur de la CEC ($\text{cmol}^+.\text{kg}^{-1}$) avant et après culture pour les différentes conditions.....	159
<u>Tableau III.13</u> : Nombre d'espèces par m^2 et nombre d'espèces introduites relevées dans chaque parcelle et pour chaque condition de culture.....	161
<u>Tableau III.14</u> : Coefficient d'abondance-dominance de Braun Blanquet (1964) pour les différentes espèces introduites en fonction des conditions de culture.....	162
<u>Tableau III.15</u> : Teneurs totales et biodisponibles (extraction au CaCl_2) de l'As, du Pb, du Cd, de l'Sb, et du Cu avant la mise en culture pour les différentes conditions de culture.....	166
<u>Tableau III.16</u> : Fraction biodisponible (%) de l'As, du Pb, du Cd, de l'Sb et du Cu avant la mise en culture en fonction des différentes conditions.....	167
<u>Tableau III.17</u> : Indice de Jacquard calculé entre chaque condition.....	178

<u>Tableau III.18</u> : Teneurs en ETM dans la biomasse aérienne des plantes en fonction des conditions de culture.....	184
<u>Tableau III.19</u> : Mesures indirectes de la respiration à l'obscurité (R_d , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du point de compensation lumineuse (Γ , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de l'éclairement saturant (I_s , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du taux maximal d'assimilation nette du CO_2 (Pn_{maxPPFD} , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et du rendement quantique de la fixation du CO_2 (ΦCO_2 , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	202
<u>Tableau III.20</u> : Coefficients directeurs des courbes de saturation lumineuse de <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> lorsque l'éclairement est compris entre 1000 et 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	203
<u>Tableau III.21</u> : Mesures indirectes de la photorespiration (R_i , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du point de compensation en CO_2 (Γ^* , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du taux de carboxylation maximal ($V_c \text{ max}$, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et du taux maximal d'assimilation nette du CO_2 (Pn_{maxCi} , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) déterminés à partir des courbes de saturation en CO_2 réalisées à une intensité lumineuse de 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	205
<u>Tableau III.22</u> : Impact de la forme et de la concentration de l'As inorganique sur les paramètres photosynthétiques et biochimiques de <i>S. nigrum</i> et <i>V. faba</i> cultivées en solution hydroponique, résultats du test ANOVA avec les différences significatives (*, **, ***, F-test significatif à $P \leq 0,05$, 0,01 et 0,001, respectivement) et non significatives (NS) par rapport aux conditions contrôles, BM lip = Biomarqueur lipidique.....	216

Abréviations

A	Coefficient Abondance-Dominance de Braun Blanquet
ABC	ATP Binding Cassette
ACP	Analyses en Composante Principale
ADEME	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	Acide δ -aminolévulinique
ALAD	Enzyme 5-aminolévulinate déhydratase
ANOVA	Analyse de la Variance
AP	Auzon Pollué
AT	Auzon Témoin
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATSDR	Agence for Toxic Substances and Diseases Registry
As(0)	Arsenic natif
As(III)	Arsénite
As(V)	Arséniate
AV	Association Végétale
BA	Biomasse aérienne
BRGM	Bureau de Recherche Géologique et Minière
CAH	Complexe Argilo-Humique
Car	Caroténoïdes
CCA	Arséniate de Cuivre Chromé
CEC	Capacité d'Echange Cationique
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
Ci	Concentration intercellulaire en CO ₂
CIRC	Centre international de Recherche sur le Cancer
DGPR	Direction Générale de la Prévention des Risques
DMA	Diméthylarsenic
DOC	Carbone Organique Dissout
DRIRE/DREAL	Direction Régionale de l'Industrie Recherche et Développement / Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
E	Indice d'Equitabilité
EEA	European Environment Agency
EPA	Environmental Protection Agency
ERO	Espèce Réactive à l'Oxygène
ESR	Evaluation Simplifiée des Risques
ETM	Eléments Traces Métalliques
ETP	Evapotranspiration
F₀	Fluorescence minimale
FB	Facteur de Bioaccumulation
FE	Facteur d'enrichissement
F_m	Fluorescence maximale
FPGN	Fond PédoGéochimique Naturel
FT	Facteur de Translocation
Fv/Fm	Efficience photochimique maximale des PSII
gs	Conductance stomatique
H'	Indice de Shannon
ICP AES	Inductively Coupled Plasma / Atomic Emission Spectrometry

ICPE	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement
IEM	Interprétation d'Etat des Milieux
IGN	Institut Géographique National
I_J	Indice de Jacquard
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
I_s	Eclairement saturant
ITC	Institut Technique du Chanvre
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LHC	Antennes collectrices (Light Harvesting Complex)
MMA	Monométhylarsenic
MDA	Malonyldialdéhyde
MEDDTL	Ministère de l'Environnement, du Développement Durable, des Transports et du Logement
MF	Matière Fraîche
MO	Matière Organique
MS	Matière sèche
MT	Métallothionéines
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
PC	Phytochélatines
Pn	Taux de Photosynthèse nette
Pn max_{Ci}	Taux maximal d'assimilation nette du CO ₂
Pn max_{PPFD}	Taux maximal d'assimilation nette du CO ₂
PPRI	Plan de prévention du risque inondation
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q_A, Q_B	Quinones A ou B
R_d	Respiration à l'obscurité
R_i	Photorespiration
RMQS	Réseau de Mesure de la Qualité des Sols
RU	Réserve en eau Utile
RuBisCO	Ribulose-1,5-diphosphate Carboxylase/Oxygénase
RUBP	Ribulose 1,5-bisphosphate
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
SOD	Superoxyde Dismutase
Tr	Transpiration
T	Terreau (condition de référence)
TBARS	Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique
TCA	Acide Trichloroacétique
TE	Teneur en Eau
TI	Indice de Tolérance
TMA	Triméthylarsenic
TMAO	Oxyde de Triméthylarsine
TPU	Phosphates trioses
VCI	Valeur Constat d'Impact
V_c max	Taux de carboxylation maximal de la Rubisco
VDSS	Valeurs de Définition de Source Sol
ΦCO₂	Rendement quantique foliaire de la fixation du CO ₂
ΦPSII	Effizienz photochimique effective des PSII
Γ	Point de compensation lumineux
Γ*	Le point de compensation en CO ₂ .

Introduction générale

Les activités anthropiques (industrielles, minières et agricoles), qui se sont intensifiées au cours du siècle dernier, ont entraîné une accumulation de certains Eléments Traces Métalliques et métalloïdes (ETM). Ceux-ci sont responsables d'une altération de la qualité des sols, du fonctionnement des écosystèmes et de la qualité des eaux souterraines dans certaines zones (Citeau, 2008). De plus, contrairement aux composés organiques, les ETM ne sont pas biodégradables, ils peuvent donc s'accumuler dans la lithosphère, intégrer la chaîne trophique et ainsi être à l'origine de problèmes de santé publique (Garbisu et Alkorta, 2001).

Parmi tous les polluants métalliques et métalloïdes, l'arsenic est naturellement présent à l'état de traces mais son accumulation dans l'environnement résulte principalement d'apports anthropiques qui représentent trois fois les apports naturels (Mandal et Suzuki, 2002). Depuis 1987, l'arsenic est classé comme « cancérigène pour l'homme » avec une côte de "1" par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Sa concentration maximale dans l'eau potable est limitée en France à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ par le décret 2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif « aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles ». Cependant, les différentes normes en vigueur ne prennent en compte que la concentration en arsenic total alors que sa toxicité dépend de sa spéciation. A l'heure actuelle, l'ordre de toxicité des espèces arsénisées n'est pas totalement établi mais il est admis que les espèces inorganiques qui sont les principales rencontrées dans l'environnement sont les formes les plus toxiques, l'As(III) étant plus toxique que l'As(V) (Mandal et Suzuki, 2002).

L'Europe et notamment la France sont les héritières d'un passé industriel et minier qui pèse aujourd'hui sur l'état des sols. La politique française ne bénéficie pas encore d'un cadre juridique particulier pour la gestion des sols. La législation vise en principe la dépollution par le pollueur, ou avec son financement, de tous les sites identifiés comme sensibles depuis le principe pollueur-payeur (adopté par l'OCDE en 1972, mis en application en France par l'article 110-1, II, 3° du code de l'environnement en 2010, 1^{ère} adoption en 2000). Cette stratégie, coûteuse, et difficile à appliquer dans le cas des pollutions diffuses et des sites orphelins s'est infléchie et a évolué vers une politique de gestion des risques au cas par cas. Celle-ci repose sur une démarche d'Interprétation d'Etat des Milieux (IEM) qui évalue les risques en prenant mieux en compte les milieux (eau, air, sol, écosystèmes) et toutes les voies d'exposition. Parallèlement, la législation relative aux Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE) (code de l'environnement, article L 511-1, alinéa 1^{er}) impose à ces structures une connaissance et une gestion des pollutions et nuisances qu'elles occasionnent. A ce jour, la France compte 251 000 sites industriels ou miniers susceptibles de présenter un risque environnemental réel, et selon la base de données BASOL, 4 400 sites sont aujourd'hui

reconnus comme pollués ou potentiellement pollués parmi lesquels 12 % sont contaminés par l'As. Dans ce contexte, la préservation des sols et la réhabilitation des sites pollués représentent aujourd'hui un des enjeux principaux de la politique de développement durable.

Actuellement, les projets de réhabilitation de sites pollués exigent souvent l'excavation des sols et le transport onéreux des terres vers les installations de dépollution. Sur le terrain, les techniques de traitements thermiques et physico-chimiques sont les plus répandues. Ces méthodes sont valables dans le cadre de pollutions importantes et localisées mais certains procédés biologiques moins destructifs vis-à-vis des sols tout en étant extensifs et de coût modéré voient progressivement le jour. Une partie de ces procédés, basée sur l'utilisation des plantes, est réunie sous le terme de phytoremédiation. Il s'agit de technologies émergentes qui utilisent les propriétés des plantes et des microorganismes associés pour dégrader, extraire, contenir ou immobiliser les contaminants du sol. Les deux principales techniques sont la phytoextraction qui consiste à extraire le polluant du sol et à l'accumuler dans les parties aériennes des plantes et la phytostabilisation utilisée pour immobiliser les polluants au niveau du sol rhizosphérique et ainsi limiter les pertes par lessivage ou érosion du sol. Sur les sites industriels, où le niveau de contamination est souvent très élevé, la phytoextraction n'est pas pertinente, elle nécessiterait une période de traitement de plusieurs dizaines d'années. La phytostabilisation a donc été privilégiée pour le traitement de sites industriels très pollués. Cette technique peut être améliorée par l'ajout d'amendements au sol permettant d'augmenter le pouvoir de fixation des ETM et diminuer ainsi leur disponibilité.

L'objectif de ce travail de thèse est double :

- Evaluer l'impact et l'accumulation des ETM, et plus particulièrement de l'As, chez les végétaux supérieurs en identifiant et en quantifiant les perturbations physiologiques et biochimiques occasionnées par ce polluant ;
- Réhabiliter et valoriser un site industriel contaminé aux ETM et métalloïdes par la mise en place d'un couvert végétal adapté pour favoriser l'immobilisation des polluants du sol et ainsi limiter leur transfert vers les écosystèmes voisins (nappes phréatiques, rivières, ...) ou dans la chaîne alimentaire.

Ce projet de recherche a été effectué en plusieurs étapes.

- Dans un premier temps, il a été réalisé un travail de demande des autorisations et des analyses des paramètres pédo-chimiques des sols de 4 sites pollués répartis dans la région Auvergne (Issoire (63) et Auzon (43)) et dans le département de l'Aveyron (Viviez et Engualès) (Annexe I). Le site atelier retenu est un ancien site industriel localisé à Auzon en Haute Loire (Auvergne, France). Les principales raisons de ce choix étaient l'existence d'une

pollution en ETM significative, l'accessibilité facile du site, la topographie du terrain et surtout l'obtention des autorisations nécessaires auprès du Conseil Général de la Haute Loire, de la Préfecture de la Haute Loire et de la Mairie d'Auzon pour accéder au site et sa mise à disposition pour nos expérimentations. Notre attention s'est concentrée sur la caractérisation pédochimique et floristique du site d'étude et sur la détermination qualitative, quantitative et spatiale des polluants du sol.

- Dans un second temps, une sélection d'espèces végétales a été testée en conditions contrôlées pour mesurer l'impact physiologique de la pollution en ETM et leur capacité à se développer sur un sol pollué. Une application d'un protocole de phytostabilisation aidée a ensuite été réalisée sur site afin d'apprécier l'utilisation de ce type de procédé dans le traitement de sites fortement contaminés.

- Enfin, afin d'évaluer les effets d'un stress arsénié, deux espèces végétales, *Vicia faba* (espèce sensible) et *Solanum nigrum* (espèce tolérante), ont été cultivées en hydroponie en présence des formes inorganiques de l'arsenic, l'arsénite (As(III)) et l'arséniate (As(V)). Un suivi physiologique et biochimique des plantes a été réalisé pour caractériser la toxicité de l'As sur celles-ci et approfondir les connaissances des mécanismes de tolérance mis en jeu.

Première partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre I : Problématique de la pollution des sols par les éléments traces métalliques et métalloïdes

Le sol est une ressource essentielle pour les sociétés humaines et les écosystèmes. Etant soumis à des pressions de plus en plus importantes (productions agricoles et forestières, développements urbains et industriels, réseaux de transport, activités de loisirs...) et n'étant pas une ressource renouvelable à l'échelle de temps humaine, il est nécessaire d'en assurer la protection afin de permettre un développement durable des sociétés.

Le sol représente généralement un lieu d'accumulation des apports anthropiques passés et présents en éléments non biodégradables comme les Éléments Traces Métalliques (ETM). La pollution du sol par certains ETM et métalloïdes, tels que l'As, le Pb, le Cd, le Hg et le Zn, est devenue un problème majeur défini comme prioritaire par les directives européennes que sont la stratégie thématique sur les sols (COM(2006)231) et la directive cadre sur les sols (COM(2006)232) adoptées en 2007 par le Parlement Européen.

1. Description et intérêt d'un sol

1.1. Définition et fonctions principales d'un sol

Le sol est généralement défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre. Il est constitué de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes vivants. C'est un compartiment complexe, un carrefour multifonctionnel à l'interface entre lithosphère, hydrosphère, atmosphère qui abrite la majeure partie de la biosphère (Figure I-1).

Source de denrées alimentaires, de biomasse et de matières premières, le sol sert de plate-forme pour les activités humaines, constitue un élément du paysage et du patrimoine culturel et joue un rôle central en tant qu'habitat et pool génique. Il assure des fonctions de stockage, de filtration et de transformation de nombreuses substances, y compris l'eau, les nutriments et le carbone. C'est l'un des puits de carbone le plus important au monde (1 600 gigatonnes) (IPCC, 2007). Ces fonctions doivent donc être protégées en raison de leur importance socio-économique et environnementale.

La société américaine de science du sol a défini, en 1992, la qualité des sols comme étant *"la capacité d'un type de sol donné à fonctionner, au sein d'écosystèmes naturels ou aménagés, pour supporter une production végétale et animale, maintenir ou améliorer la*

qualité de l'eau et de l'air et assurer l'habitat et la santé humaine". De nombreux programmes de surveillance de la qualité des sols ont été mis en place ces dernières années en Europe. 27 pays européens sont aujourd'hui dotés de réseaux de surveillance de la qualité des sols (Bispo et Arrouays, 2008). En France, le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) a été mis en place à partir de 2001, il est piloté par le Groupement d'Intérêt Scientifique sur le sol (GIS sol) et l'unité INFOSOL de l'INRA d'Orléans (Jolivet *et al.*, 2006). Il repose sur le suivi de plus de 1650 sites répartis régulièrement sur le territoire métropolitain selon une grille de maille carrée de 16 km de côté (Jolivet *et al.*, 2006).

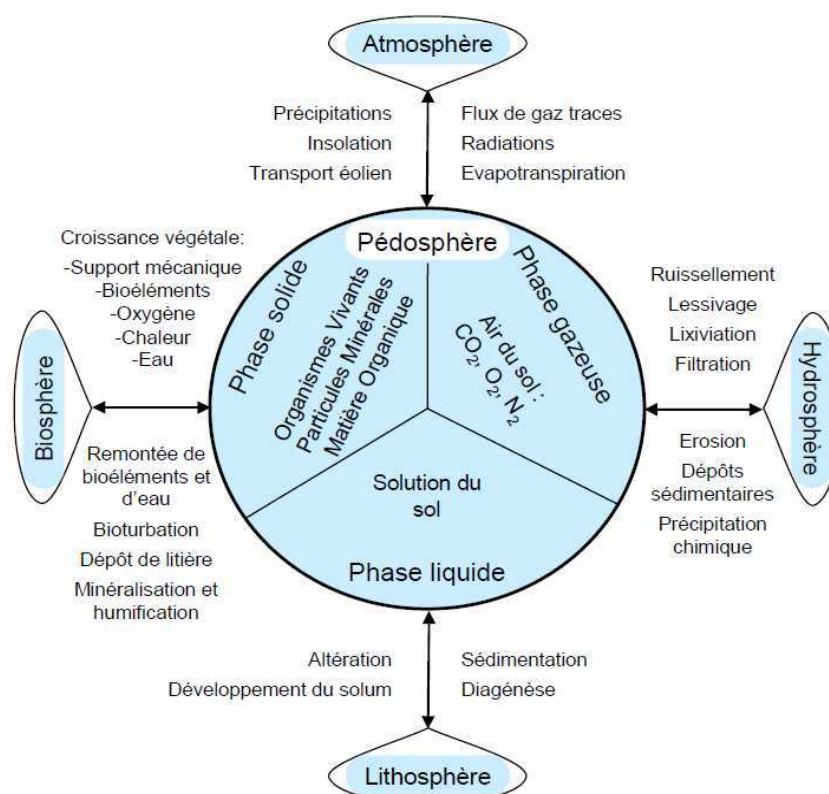


Figure I-1 : Organisation du sol et principales relations avec les autres compartiments (Gobat *et al.*, 2003).

1.2. Formation d'un sol

Le sol est une entité vivante, dynamique et nécessaire au fonctionnement des écosystèmes terrestres. La formation d'un sol est le résultat de l'altération, du remaniement et de l'organisation des couches supérieures de la croûte terrestre (Figure I-2) influencée à la fois par le climat, le relief, les organismes vivants, l'activité humaine et les échanges d'énergie qui s'y manifestent (Citeau *et al.*, 2008). C'est un processus lent, la vitesse de constitution d'un sol

est habituellement comprise entre 100 et 400 an.cm⁻¹ (Bur, 2008). Le sol est donc considéré comme une ressource non renouvelable à l'échelle humaine.

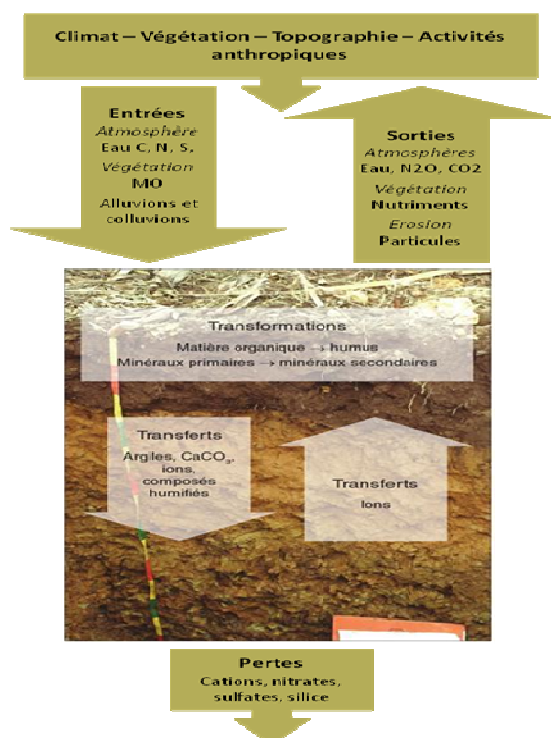


Figure I-2 : Mécanismes de base de la pédogénèse (Citeau *et al.*, 2008).

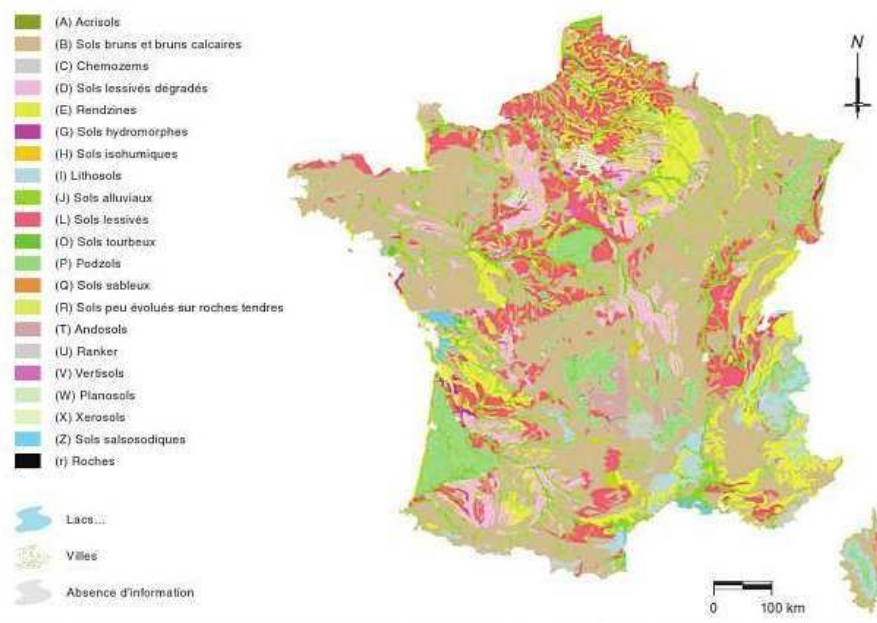


Figure I-3 : Cartes des sols de France (Citeau *et al.*, 2008).

C'est un milieu extrêmement complexe et variable. En fonction de la nature du matériau d'origine, du climat, du relief, et de la nature et de l'activité des organismes qui le colonisent, différents types de sols peuvent être formés. En France, 15 à 20 grands types de sols ont été distingués (Figure I-3), et plus de 320 ont été répertoriés en Europe (Jones *et al.*, 2005). Chacun d'entre eux présente des variations considérables en matière de propriétés physiques, chimiques et biologiques.

1.3. Processus de dégradation des sols

La dégradation de la qualité des sols peut être définie comme la diminution ou la disparition de sa capacité à remplir une ou plusieurs de ses fonctions (Citeau *et al.*, 2008). Toute dégradation de sa structure détériore également les autres milieux naturels et écosystèmes. Différents processus de dégradation ou de menaces peuvent être cités : l'érosion, la diminution de la teneur en matières organiques, la contamination locale et diffuse, l'acidification, l'imperméabilisation, le tassement, la diminution de la biodiversité des sols, la salinisation, les inondations et les glissements de terrain (Jones *et al.*, 2005). L'érosion des sols est principalement provoquée par l'eau et, dans une moindre mesure, par le vent. Ce processus est, avec la diminution des teneurs en matière organique, responsable d'une baisse de la productivité des sols et dans un cadre plus général entraîne une diminution des fonctions du sol. La protection de la biodiversité vise à préserver les organismes du sol qui remplissent des fonctions écologiques essentielles notamment dans la formation du sol (amélioration de la structure, dégradation de la matière organique complexe notamment des débris végétaux), et dans le maintien de la fertilité des sols. Le tassement, l'imperméabilisation et les mouvements de terrains concernent la dynamique physique du sol. Ils ont des conséquences importantes sur la perméabilité du milieu ce qui implique des perturbations fortes de ses écosystèmes. Enfin, la pollution représente une problématique importante, elle présente des risques pour les écosystèmes, les chaînes alimentaires, et donc pour la santé humaine et animale. Il a été distingué les contaminations diffuses peu intenses mais chroniques et généralisées, des contaminations ponctuelles lorsque la source de pollution est clairement localisée (Chassin *et al.*, 1996).

2. Contamination par les éléments traces métalliques ou métalloïdes

2.1. Définition des Eléments Traces Métalliques (ETM)

La notion « d'Éléments Traces Métalliques » (ETM) est mal définie, néanmoins, celle-ci se substitue peu à peu à celle de « métaux lourds » (Miquel, 2001). Les éléments traces regroupent 80 éléments chimiques constituant la croûte terrestre, dont les ETM, ils représentent 0,6 % du total, alors que les 12 éléments majeurs (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P et Mn) interviennent pour 99,4 % (Baize, 1997). Ce terme générique « d'Eléments Traces Métalliques » désigne des métaux réputés toxiques et dont la teneur moyenne dans les sols est inférieure à 1 g.kg^{-1} . De même, les métalloïdes tels que l'As ou l'Sb sont présents en traces dans la croûte terrestre et considérés comme toxiques. Leurs propriétés physiques et chimiques sont intermédiaires entre celles d'un métal et d'un non métal, ils sont définis comme des semi-métalliques. Ils sont notamment caractérisés par les propriétés suivantes (Burnol *et al.*, 2006) :

- Leurs oxydes sont généralement amphotères ;
- Ils se comportent comme des semi-conducteurs.

Cependant, le terme métalloïde n'est plus en usage selon l'IUPAC (Connelly *et al.*, 2005), il n'est pas mentionné dans le *Gold Book* qui reconnaît en revanche les termes métal et non-métal.

Pour une meilleure lisibilité de ce rapport, les métalloïdes (As et Sb) sont inclus dans le terme ETM.

2.2. Sources naturelles des ETM

Tous les sols contiennent naturellement des ETM. Ainsi, leur seule présence n'est pas indicatrice d'une pollution. La concentration des ETM dans des sols non contaminés par l'activité humaine est essentiellement liée à la géologie du matériau parent à partir duquel le sol s'est formé. Selon la géologie locale, la concentration en ETM dans un sol peut dépasser les domaines de variation couramment admis.

Le fond pédogéochimique naturel (FPGN) est la concentration d'un élément chimique dans un sol (que ce soit un élément majeur ou un ETM) résultant des évolutions naturelles, géologiques et pédologiques, en dehors de tout apport d'origine humaine (Baize, 1997). Cette teneur dépend aussi bien de la roche originelle constituant le sol (matériau parental ou roche-

mère) que des processus pédogéochimiques, altérations, lixiviations, migrations, redistributions, intervenus lors des périodes géologiques de formation du sol, qui ont pu lessiver ou concentrer l'élément en question. D'un point à un autre d'un territoire, ce FPGN peut varier très largement. Le fond pédogéochimique est donc défini par une valeur moyenne et une variabilité dépendant de l'échelle spatiale considérée (région donnée, horizon de référence...). Un état des connaissances sur le fond pédogéochimique à l'échelle nationale de la France et de ses régions a été rédigé par Darmendrail *et al.* (2000). Ils se basent notamment sur les travaux de Baize (1997) et décrivent les différentes bases de données développées en France. Le FPGN peut être à l'origine de teneurs relativement élevées des ETM dans l'horizon de surface, il s'agit d'anomalies naturelles (Tableau I-1).

Tableau I-1 : Gammes de valeurs ordinaires et d'anomalies naturelles de certains ETM dans divers horizons de sols, pas seulement les horizons de surface labourés. Les teneurs sont exprimées en mg.kg⁻¹ de "terre fine" (< 2 mm) (Baize, 2010).

mg.kg⁻¹	Gamme de valeurs couramment observées dans les sols "ordinaires" de toutes granulométries*	Gamme de valeurs observées dans le cas d'anomalies naturelles modérées	Gamme de valeurs observées dans le cas de fortes anomalies naturelles
As	1 - 25	30 - 60	60 - 284
Cd	0,05 - 0,45	0,7 - 2,0	2,0 - 46,3
Cr	10 - 90	90 - 150	150 - 3180
Co	2 - 23	23 - 90	105 - 148
Cu	2 - 20	20 - 62	65 - 160
Ni	2 - 60	60 - 130	130 - 2076
Pb	9 - 50	60 - 90	100 - 10180
Zn	10 - 100	100 - 250	250 - 11426

*Valeurs du réseau national d'études des sols agricoles ASPITET relevées sur plus de 1800 sols, INRA (1993-2005)

2.3. Apport d'origine anthropiques des ETM

L'origine anthropique de la pollution des sols peut être de différentes natures. La contamination diffuse des sols est généralement liée aux dépôts atmosphériques (émissions dues à l'activité industrielle, automobiles, chauffage). Les contaminations ponctuelles du sol se distinguent par la présence localisée de substances dangereuses provenant généralement de déversements, de fuites ou de dépôt de déchets. Ces substances, non confinées et en fortes concentrations, donnent naissance à des "sites localement contaminés" (NF ISO 11074-1, 1997), les sites miniers et industriels rentrent dans ce cadre. Les pratiques agricoles peuvent générer des pollutions par des apports d'origine minérale ou organique à l'échelle de la parcelle (amendements et traitements phytosanitaires).

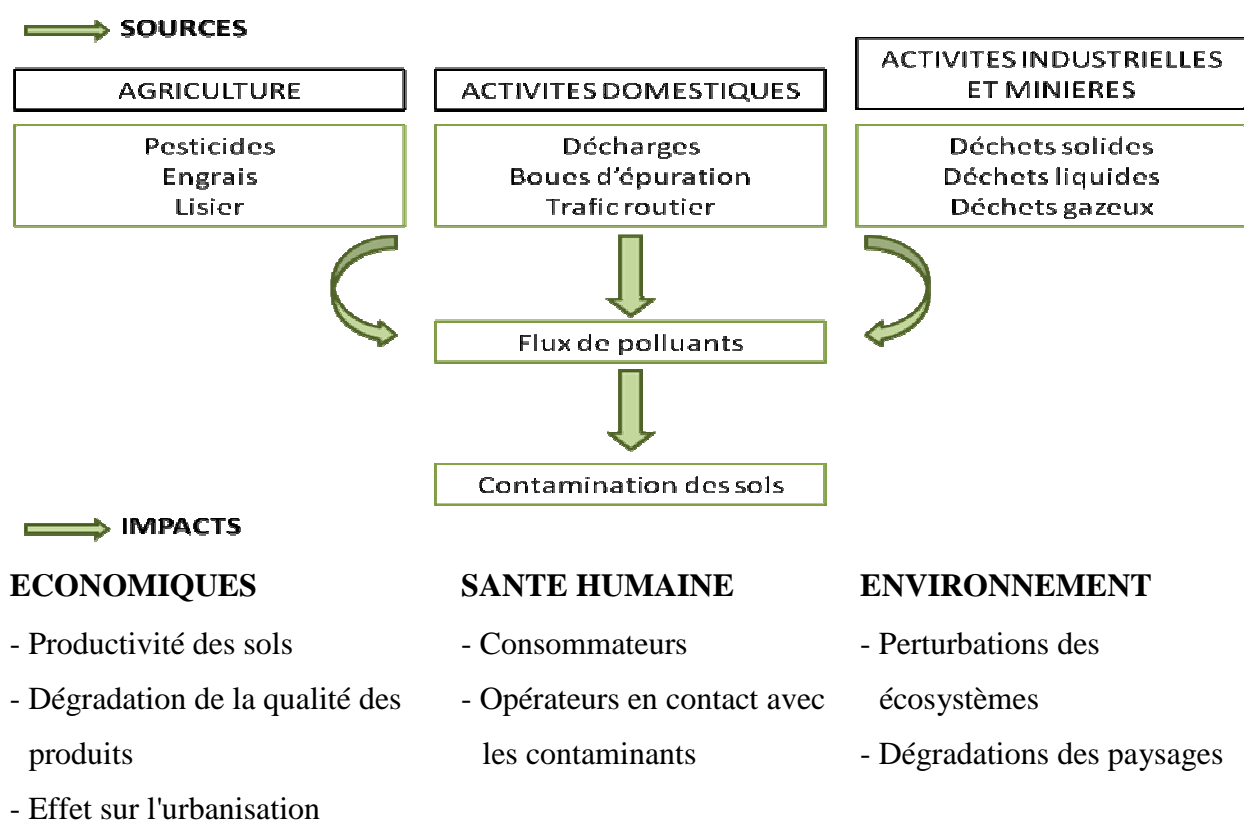


Figure I-4 : Les diverses sources de pollutions des sols et leurs conséquences.

Un sol est considéré comme pollué quand il contient un ou plusieurs polluant(s) ou contaminant(s) susceptibles de causer des altérations biologiques, physiques et chimiques de l'écosystème constitué par le sol (AFNOR, 1994) (Figure I.4). Le sol est à l'interface de l'eau et de l'air. La notion de pollution du sol appelle donc généralement à la contamination d'un ou plusieurs composants des écosystèmes (atmosphère, milieux aquatiques) ou à l'accumulation

et à un transfert des polluants vers la chaîne trophique par des organismes en contact direct ou indirect avec le sol (plantes, mésofaune, champignons, bactéries). Au-delà d'un certain seuil et suivant leur nature chimique, les teneurs en ETM peuvent ainsi devenir toxiques pour les organismes vivants, s'accumuler dans les chaînes alimentaires des écosystèmes et altérer la biodiversité des sols (Figure I-4).

La pollution d'un sol en ETM était évaluée jusqu'en 2007 en utilisant des "valeurs guides françaises" éditées par le BRGM : Valeurs guides de Constat d'Impact pour usage sensible et non sensible (VCI) et dite de "Définition de Source-Sol" (VDSS) (Tableau I-2). La Valeur de Constat d'Impact (VCI) est développée selon une méthode nationale d'évaluation simplifiée des risques pour la santé humaine (études génériques), permettant de constater l'impact de la pollution d'un milieu, en fonction de son usage. Elles intègrent les différentes voies d'exposition et prennent en compte les risques chroniques pour la santé des populations liés à l'utilisation du site. Deux types d'usages sont identifiés, l'un sensible (résidentiel avec potager), l'autre non sensible (industriel). Ces valeurs sont définies selon les critères français ou à défaut par des valeurs guides allemandes, hollandaises ou américaines (EPA, 1996). La Valeur de Définition de Source-Sol (VDSS) est une valeur guide définie pour une substance donnée lors de la réalisation d'un diagnostic initial et d'une évaluation simplifiée des risques (ESR) (DRIRE aujourd'hui DREAL, 2005). Elle doit permettre d'identifier une source de pollution constituée de sols, et d'en délimiter sa surface. Cette valeur est valable pour la source quelques soient les milieux de transfert et d'exposition retenus dans le schéma conceptuel du site ou de la source.

Tableau I-2 : Valeurs guides (VDSS et VCI) en matière de pollution des sols en mg.kg⁻¹ de sol sec (BRGM, 2002).

mg.kg ⁻¹	Sb	As	Cd	Cr	Co	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
VDSS	50	19	10	65	120	95	3.5	70	200	4500
VCI sensible	100	37	20	130	240	190	7	140	400	9000
VCI non sensible	250	120	60	7000	1200	950	600	900	2000	-

L'établissement de ces valeurs seuils en métaux et métalloïdes dans les sols a été réalisé à titre indicatif dans le cadre de la mise en œuvre de la méthode nationale d'évaluation simplifiée des risques (ESR) et à titre de comparaison dans le cadre de l'examen des

diagnostics approfondis. L'ESR reposait essentiellement sur la seule connaissance de la pollution du sol et des nappes, évaluée à l'instant et au vu d'éventuels dépassements de seuils. Cette évaluation ne prenait pas en compte les notions de disponibilité et de spéciation de l'élément dans le sol, ni la phase vapeur/particulaire susceptible de contaminer par inhalation les humains ou animaux, ni la contamination de l'alimentation, ni les synergies entre polluants ou entre polluant et milieu. En 2008, une circulaire implique de passer d'une simple Evaluation Simplifiée des Risques (ESR) à une démarche d'Interprétation d'Etat des Milieux (IEM) et à des plans de gestion (Figure I-5), même en l'absence de valeurs VDSS et VCI. Cette circulaire demande maintenant une modélisation des risques en prenant mieux en compte les milieux (eau, air, sol, écosystèmes) et toutes les voies d'exposition. Il s'agit de s'assurer que l'état des milieux est compatible avec des usages déjà fixés ou constatés. Un plan de gestion peut être mis en place pour agir aussi bien sur l'état du site (par des aménagements ou des mesures de dépollution) que sur les usages qui peuvent être définis.

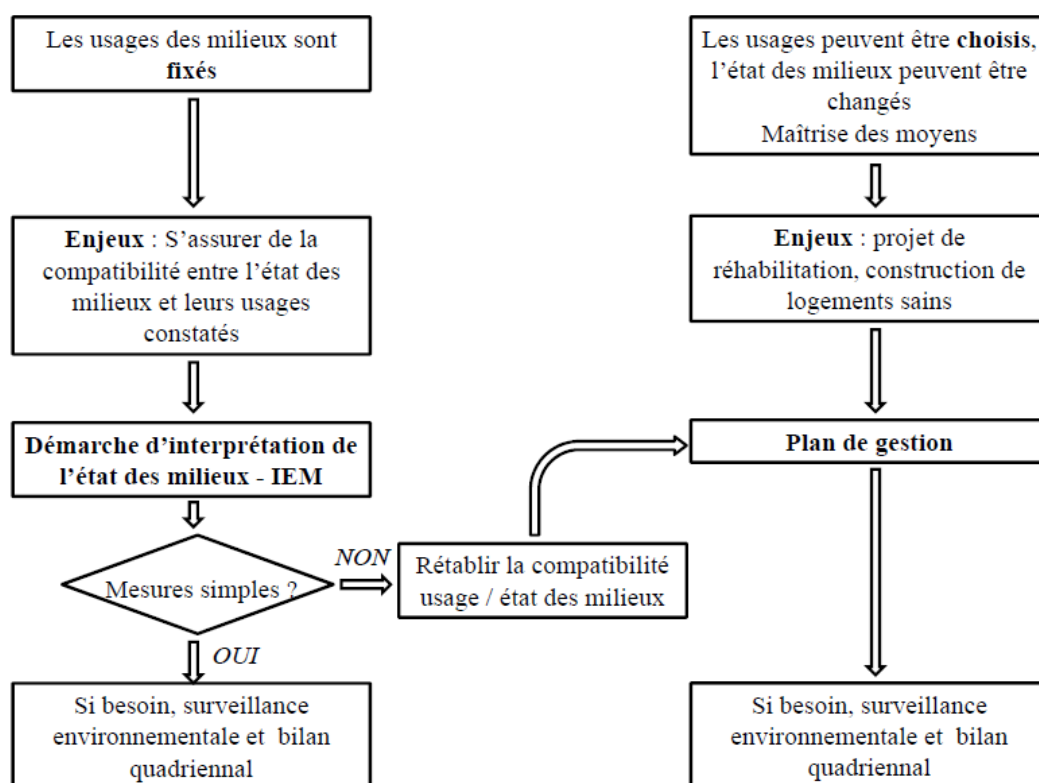


Figure I-5 : Deux démarches de gestion possibles, IEM ou plan de gestion (MEDDTL, 2007).

2.4. Localisation des ETM dans les sols et spéciation chimique

Tous les ETM sont potentiellement polluants. Leur nocivité est fonction de leur concentration dans le sol mais également de leur spéciation chimique et de leur biodisponibilité. En effet, l'impact potentiel des ETM sur la biosphère dépend en grande partie de leur passage dans la solution de sol (MacDonald et Hendershot, 2006 ; Fest *et al.*, 2008). Cette toxicité est donc en relation étroite avec la mobilité des composés métalliques qui dépend elle-même de leur spéciation chimique (Batley, 1989). Ainsi, une attention particulière doit être portée à l'étude des différentes phases porteuses des ETM. En effet, il est bien établi que les ETM contenus dans la matrice cristalline des minéraux sont moins biodisponibles que ceux présents sur les sites superficiels d'adsorption des particules ou associés aux carbonates et à la matière organique susceptibles d'être mobilisés dans la phase dissoute et donc facilement assimilables par les plantes ou les organismes du sol (Figure I-6).

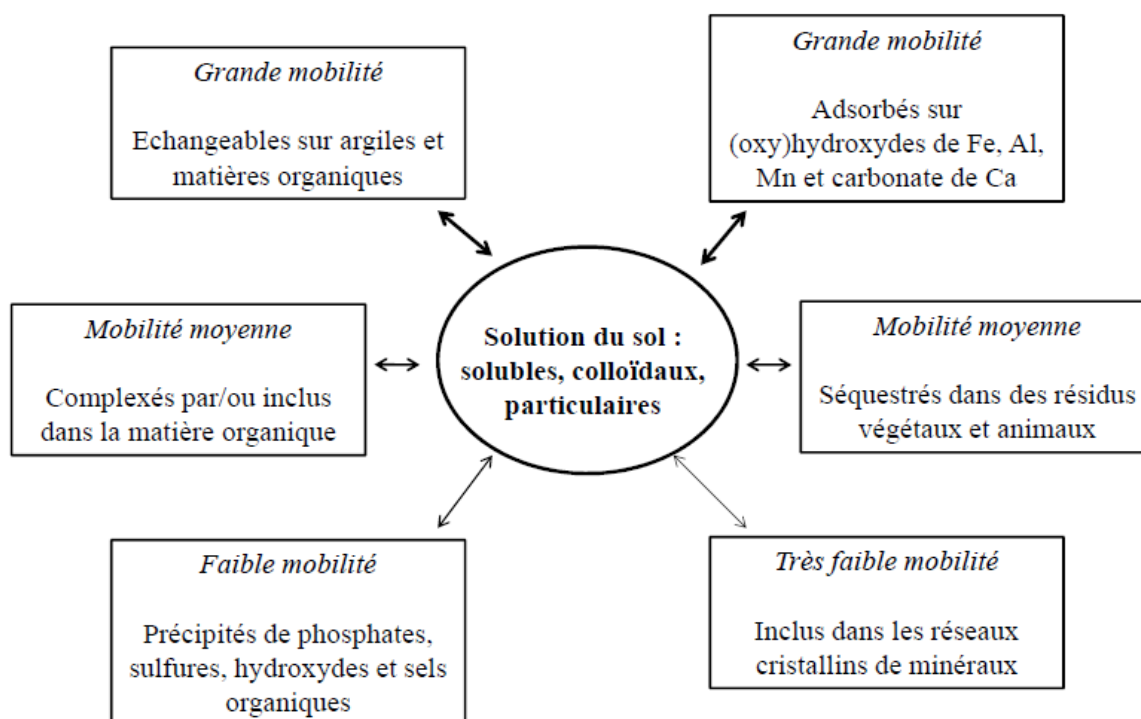


Figure I.6 : Phases porteuses des ETM dans les sols et influence sur leur mobilité (Juste, 1995).

2.4.1. Phases porteuses des ETM dans les sols

Les phases porteuses des ETM dans le sol contrôlent leur migration, leur biodisponibilité et donc leur toxicité. La disponibilité des ETM est essentiellement commandée par des processus d'adsorption à la surface des particules ou d'incorporation à l'intérieur des phases solides (Figure I-6). La répartition des ETM dans les différentes phases du sol n'est pas figée au cours du temps et va donc dépendre des caractéristiques de l'élément (spéciation chimique, valence, réactivité) et des conditions du milieu (pH, CEC, potentiel d'oxydo-réduction) (Citeau *et al.*, 2008).

La notion de biodisponibilité a été définie par Baize en 2007 comme "*l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (microflore, faune, flore et homme)*". La biodisponibilité résulte de l'interaction de trois paramètres (Baize, 2007) :

- L'espèce chimique présente dans la solution du sol (nature et concentration) ;
- Les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol ;
- L'organisme vivant considéré.

Dans ce contexte, le terme « mobilité » acquiert un aspect négatif d'un point de vue environnemental, puisque le transfert d'un milieu à un autre implique généralement une réactivité et une disponibilité accrues des composés potentiellement toxiques (Förstner, 1993).

L'état de disponibilité chimique et biologique des ETM en fonction de la phase du sol à laquelle ils sont associés est détaillé ci-dessous.

Réseaux cristallins

Le réseau cristallin des minéraux primaires (directement hérités du matériau parental), contient une fraction variable d'ETM, d'origine lithologique, inclus au sein des minéraux lors de leur formation. Leur libération est très lente, elle suit le rythme des altérations de la roche mère (Baize, 2007). Certains ETM peuvent également être adsorbés par les minéraux présents dans le sol et diffusés vers l'intérieur du cristal afin de rejoindre des cavités au sein du réseau cristallin (complexe de sphère interne). Il s'agit alors d'un phénomène d'absorption et l'extraction de ces éléments métalliques des réseaux silicatés ne se fera que progressivement sous l'influence des facteurs physico-chimiques de dégradation (Pedro et Delmas, 1970). D'autre part, en ce qui concerne les hydroxydes de fer, certains éléments tels que Ni, Cu, Zn et Mo, ont la capacité de se substituer au Fe dans le réseau cristallin lors de sa formation, par un phénomène de co-précipitation (Gavalda, 2001).

Dans le cas de minéraux secondaires, la plupart des ETM sont en mesure de se substituer aux éléments majeurs constitutifs des argiles et sont donc prisonniers du réseau cristallin de ces silicates. Goldschmidt (1954) a établi qu'un ion quelconque pouvait être remplacé, pour un minéral donné, par un ion de même taille (variations de 15 à 30 % du rayon) et dont la charge ne diffère pas de plus d'une unité, sans que cela entraîne une modification notable du réseau cristallin et donc du type minéralogique. Cette substitution est d'autant plus facilitée que l'ion sera petit et fortement chargé.

Phases hydroxylées

Les oxydes et les hydroxydes sont des minéraux cristallisés qui sont principalement présents dans les argiles. Les composés du Fe, Al et Mn sont les plus fréquents. La nature et le nombre de charges électriques portées par les surfaces de ces minéraux dépendent d'une part des caractéristiques propres aux minéraux, et d'autre part des conditions physico-chimiques à l'interface solide/liquide (Calvet, 2003).

Dans la majorité des sols, les oxydes de fer et de manganèse représentent la phase de rétention privilégiée de beaucoup de métaux. En effet, les ETM, chargés positivement sous formes ioniques ou complexés, vont pouvoir être fixés sur les oxydes et hydroxydes par ionisation des groupes OH de surfaces. Le nombre de fonctions ionisées varie principalement avec la force ionique et le pH de la solution avoisinante.

Les carbonates

Les carbonates sont représentés de façon très variable dans les sols. Leur présence est gouvernée par la nature du matériau parental, les plus riches en calcaire étant d'origine principalement sédimentaire. Leur dissolution est rapide, et la présence de carbonates actifs (ou réactifs) maintient le pH du sol à une valeur élevée, provoquant un accroissement de la complexation de la majorité des ETM sur les phases particulières (Calvet, 2003). En sol calcaire, les carbonates de calcium sont les constituants majeurs qui interviennent dans la fixation des éléments traces, soit par adsorption, soit par précipitation d'hydroxydes ou de carbonates, ou encore par insertion dans le réseau de CaCO_3 (Juste, 1995). Il est fréquent que des carbonates précipitent dans les sols sous forme d'horizon d'accumulation ou de concrétions (Legros, 2007), entraînant la co-précipitation d'ETM associés.

Macromolécules organiques et complexe argilo-humique

Le Complexe Argilo-Humique (CAH), aussi appelé complexe adsorbant, est une association de minéraux argileux et de macromolécules organiques ayant des propriétés fortes de stabilisation des particules du sol (Calvet, 2003). Ce complexe possède des propriétés physico-chimiques de surface particulières qui lui confèrent un pouvoir adsorbant important, permettant de retenir des cations sous forme échangeable (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , ...). Ces cations peuvent donc s'échanger avec la solution du sol et les plantes et constituent le réservoir de fertilité chimique du sol, c'est la Capacité d'Echange Cationique (CEC) (Calvet, 2003). Celle-ci varie avec le type d'argile et de matière organique constituant le complexe argilo-humique. L'adsorption des ions métalliques à la surface des complexes argilo-humiques est réalisée par le biais d'interactions électrostatiques. La stabilité de ces liaisons dépend notamment de la charge électrique et de la taille de l'ion mis en jeu (McBride *et al.*, 1997). Même en dehors du complexe argilo-humique, les macromolécules organiques présentent généralement une affinité forte pour les ETM, du fait de leurs charges négatives en surface. Les complexes organométalliques modifient les propriétés des ETM notamment en ce qui concerne le transport et la biodisponibilité. Ainsi, la mobilité d'un ETM peut varier considérablement dans le cas où il est associé à une molécule organique, ce qui peut parfois conduire à un lessivage accru au sein du profil (Aubert *et al.*, 2001), ou à une modification de sa toxicité.

Solution du sol

La part des ETM présents en solution ne représente qu'une fraction faible de la teneur totale. Les solutions du sol tiennent un rôle fondamental dans la distribution des ETM car la plupart des réactions mises en jeu dans les processus pédologiques se produisent en phase aqueuse (Citeau *et al.*, 2008). De plus, la part d'ETM présents dans la solution du sol est considérée comme la plus facilement disponible, et donc facilement assimilable par les végétaux ou les organismes du sol. Elle doit donc être quantifiée et surveillée. En solution, les ETM sont présents sous forme de cations, d'hydroxydes ou d'oxyanions selon le rayon ionique, la charge et l'électronégativité (Pedro et Delmas, 1970). Les ions se trouvant en solution aqueuse sont toujours entourés par des molécules d'eau, le plus fréquemment de quatre à six molécules en ce qui concerne les cations. L'intensité de liaison entre l'ion métallique et les molécules d'eau dépend aussi de la charge et du rayon de l'ion.

Il est à noter que les ETM issus du fond pédogéochimique sont considérés en équilibre depuis de très longues années et associés à des phases du sol stables, toute la fraction mobile a migré (Baize, 2007). Au contraire, les apports anthropogéniques sont plus récents et sont arrivés plus rapidement, il y a donc un risque plus grand de mobilité des différentes formes. De plus, les ETM d'origine anthropique sont rejetés dans l'environnement principalement associés aux phases les plus sensibles aux changements des conditions physico-chimiques du milieu (phases hydroxylées et liées à la matière organique et la solution du sol) (Coulibaly *et al.*, 2010), ce qui peut accentuer leur mobilité et donc leur biodisponibilité.

2.4.2. Spéciation chimique des ETM dans le sol

Tableau I-3 : Forme chimique dans les sols de différents ETM, distinction entre forme adsorbée et dissoute, et composant du sol principalement associé (Bur, 2008).

Eléments	Forme chimique dans le sol	Principales phases porteuses	Forme chimique dans la solution du sol
Sb	Sb_2S_3 , FeSb_2S_4 , $\text{Pb}_4\text{FeSb}_6\text{S}_{14}$, Sb_2O_3	Oxydes Fe, MO, carbonates	SbO_4^{3-}
As	En milieu oxydant As V (H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-}) En milieu réducteur As III (HAsO_2 , AsO_2^-)	Oxyhydroxydes de Fe et Mn	H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} HAsO_2 et H_2AsO_3^-
Cd	Cd^{2+} , CdSO_4^- , CdCl^+ , CdHCO_3^+ , CdO , CdCO_3 , $\text{Cd}(\text{PO}_4)_2$, CdS , CdCl_2	CEC, carbonate	Cd^{2+} ou chélates d'acides fulviques
Cr	Cr III oxydes de Cr Cr VI HCrO_4^- , CrO_4^{2-}	Hydroxydes métalliques, composés organiques, stable seulement si pH élevé et peu de MO (effet réducteur)	
Co		Oxydes Mn et Fe, MO, argiles	
Cu	Cu^{2+} , CuCO_3	MO, hydroxydes et carbonates	Cu^{2+} si pH bas (<5), complexé aux acides fulviques solubles si pH>8
Ni	Ni^{2+} , NiSO_4 , NiHCO_3^+ , NiCO_3	MO et carbonates	
Pb	Pb^{2+} , PbHCO_3^+ , PbOH^+ , PbS , PbSO_4 , $\text{Pb}(\text{OH})_2$, PbCO_3 , PbO , $\text{Pb}(\text{PO}_4)_2$, PbCl^+	Oxydes de Fe et Al, MO, argiles	Pb^{2+} , et chélates d'acides fulviques
Zn	Zn^{2+} , ZnSO_4 , ZnHCO_3^+ , ZnCO_3 , ZnFeO_4 , ZnSiO_4 , $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$	MO, argiles, oxydes de Fe	Zn^{2+} ou chélates de composés organiques solubles

La notion de spéciation chimique d'un ETM actuellement retenue par l'IUPAC (Conelly *et al.*, 2005) a été définie par Templeton *et al.* (2000), la "*spéciation d'un élément est la distribution de cet élément entre ses différentes formes chimiques dans un système*". Ils distinguent donc le terme "spéciation" des termes "analyse de spéciation" et "fractionnement" qui se réfèrent à des activités analytiques.

L'affinité des ETM pour les différentes phases du sol dépend en partie de leurs caractéristiques intrinsèques (masse, charge, rayon atomique). Ainsi, une affinité particulière pour certaines phases du sol est observée pour chaque ETM et est fonction de la spéciation chimique de l'élément (Tableau I-3). La spéciation chimique des ETM dans le sol renseigne donc sur leur toxicité et leur disponibilité potentielle.

2.4.3. Principaux paramètres influençant la spéciation et la disponibilité des ETM

Les différents ETM présentent des affinités variables pour les particules solides et la solution du sol. La prédisposition d'un cation métallique pour la phase aqueuse est traduite par son caractère labile, qui va généralement de pair avec une mobilité importante au sein du profil de sol et une toxicité élevée (Bur, 2008). Cependant, les propriétés physico-chimiques et les constituants du sol peuvent accroître comme réduire la labilité des ETM et ainsi déterminer en partie la spéciation chimique et les phases porteuses des ETM. Seule l'influence de deux paramètres pédologiques est détaillée dans cette partie : le pH et l'oxydoréduction.

Le pH

La variation de pH (naturelle ou anthropique) semble être le facteur le plus déterminant sur la mobilité des ETM (Gandois *et al.*, 2010) et notamment dans leur mise en solution et leur mobilité à travers le solum. La diminution du pH de la solution du sol augmente le nombre de protons dans la solution du sol, ceux-ci entrent en compétition avec les cations métalliques adsorbés sur la CEC et provoquent ainsi leur mise en solution (McLaughlin, *et al.*, 2000). Inversement, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles. L'augmentation du pH provoque souvent la formation d'espèces précipitées qui peuvent limiter la solubilité et la disponibilité de toutes les espèces ioniques (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cependant, elle induit également la dissolution de matières organiques et la formation de complexes organo-métalliques plus solubles (Chaignon, 2001). Gandois et son équipe (2010) ont montré que dans les conditions alcalines (pH > 7), la solubilité de certains ETM n'est pas correctement prédite par le pH.

Dans ce cas, le pH est souvent couplé à d'autres caractéristiques physico-chimiques comme le carbone organique total ou dissous et les teneurs en Fe, ceux-ci ont, dans ce cas, une influence non négligeable sur la spéciation du métal (Gandois *et al.*, 2010). Les variations de pH ont donc des conséquences complexes et parfois contraires sur la mobilité des ETM, en particulier en présence de ligands organiques et inorganiques.

Etat d'oxydo-réduction

Les conditions d'oxydo-réduction (Eh) déterminent le comportement des éléments chimiques à plusieurs valences. Plus précisément, le potentiel d'oxydo-réduction mesure l'aptitude d'un milieu à fournir les électrons à un agent oxydant ou à retirer des électrons à un agent réducteur. Ainsi, les formes oxydées prédominent pour un potentiel redox élevé, alors que les faibles valeurs favorisent l'apparition d'espèces réduites. L'Eh des sols varie souvent avec les conditions d'hydromorphie, les valeurs les plus courantes sont comprises entre -200 mV et 400 mV (Remon, 2006). Ce domaine de variation recouvre différents degrés d'oxydation de nombreuses espèces en solution, influant ainsi directement ou indirectement sur la mobilité des métaux qui constituent ces espèces minérales. Elle influence la capacité d'un ETM à se fixer sur une phase réceptrice en modifiant le degré d'oxydation de l'élément, ou celui de la phase. Une modification du produit de solubilité de cette association potentielle peut de ce fait intervenir, en la privilégiant ou en la défavorisant.

Outre l'influence directe du potentiel redox du milieu sur l'état d'oxydation des ETM et donc sur leur mobilité, ce facteur intervient également sur les composants du sol qui fixent les métaux (Moszkowicz, 2002). Ainsi, en conditions d'aération satisfaisantes du sol, les composés ferriques et manganiques sont très peu solubles et immobilisent donc les métaux qui leur sont associés. A l'inverse, en conditions d'aération limitantes, résultant par exemple du compactage ou de la battance du sol, les composés du fer et du manganèse sont réduits et solubilisés, ils libèrent donc les ETM qui leur étaient associés.

Les travaux de Förstner (1993) résument le degré de mobilité relative des ETM en fonction du pH et du potentiel redox (Tableau I-4). L'utilité des diagrammes Eh-pH utilisés dans les études théoriques de l'équilibre oxydation-réduction est bien établie. C'est une indication simple et claire, pour l'évaluation du comportement chimique d'éléments multivalents.

La température du sol peut aussi être citée, celle-ci a un impact direct sur la mobilité des ETM en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution - précipitation et co-précipitation, et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol, le pH ou l'Eh (Garrido *et al.*, 2009).

Tableau I-4 : Effets du pH et du potentiel redox sur la mobilité des ETM du sol (Förstner, 1993).

Mobilité relative	pH		Potentiel redox	
	Neutre-alcalin	Acide	Oxydant	Réducteur
Très haute	Se, Mo	B	B	-
Haute	As	Zn, Cd, Hg, Co, Ni, (Mn)	Mo, Se	-
Moyenne	Mn	Cu, Al, Pb, Cr	Cu, Co, Hg, Ni, Zn, Cd	Mn
Basse	Pb, Fe, Zn, Cd, Ti	Fe(III), Ti	Pb, Ti	Fe, Zn, Co, Ni, Ti
Très basse	Al, Cr, Hg, Cu, Ni, Co	Mo, Se, As	Al, Cr, Fe, Mn	Al, Cr, Hg, Cu, Se, B, Mo, Cd, Pb

3. L'état des sols en Europe et en France

3.1. En France

En France, plusieurs bases de données, pilotées par le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (MEDDTL), permettent un inventaire des sites et sols pollués ou susceptibles d'avoir connus une pollution.

A ce jour, l'inventaire BASIAS compte près de 251 000 sites industriels, orphelins ou non, susceptibles d'engendrer une pollution. En 2011, 4 400 sites sont recensés comme pollués ou potentiellement pollués dans la base de données BASOL (Figure I-7). Plus de la moitié d'entre eux (2 276) sont sous surveillance et la pollution est avérée pour 21,73 % d'entre eux. D'après BASOL (2006), le Pb est l'ETM le plus rencontré sur les sites pollués (17,5 %), et 12 % des sites répertoriés sont contaminés à l'As (Figure I.8).

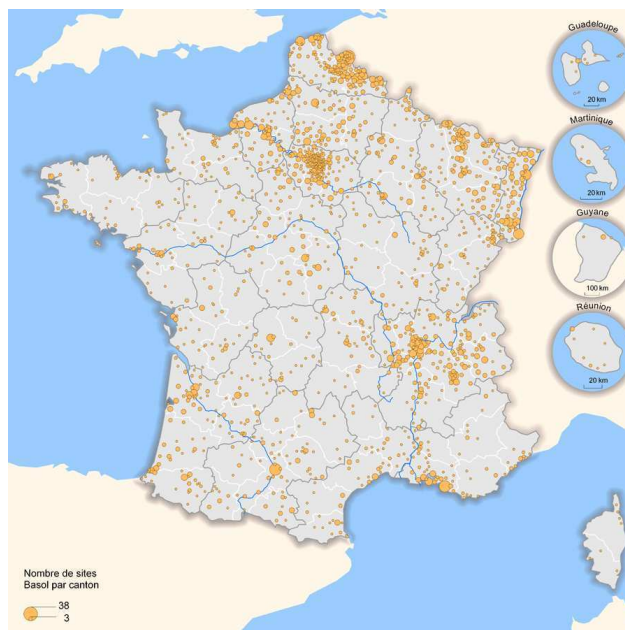


Figure I-7 : Les sites et sols pollués en 2009 (sites sur lesquels l'Etat a entrepris des actions au 9 juillet 2009) (MEDDTL, DGPR - BASOL, 2009).

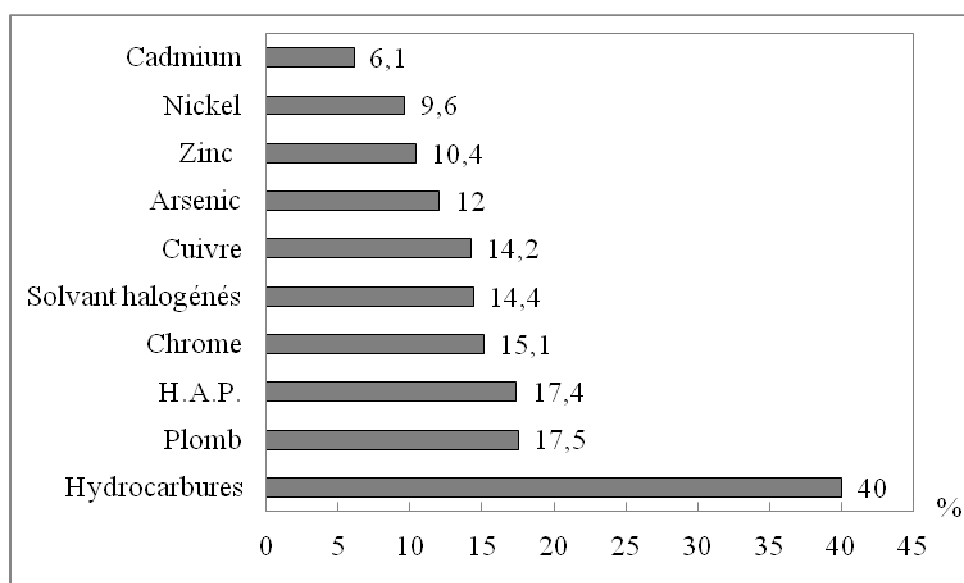


Figure I.8 : Nature des polluants rencontrés sur les sites pollués français (BASOL, 2006).

La Figure I-9 représente la répartition des sites pollués par région, 3 régions présentent un nombre de sites supérieur à 400, il s'agit de Rhône Alpes, le Nord Pas de Calais et l'Ile de France, qui compte respectivement 599, 559 et 409 sites. En région Auvergne, 82 sites sont considérés comme pollués, répartis principalement dans les départements du Puy de Dôme et de la Haute Loire.

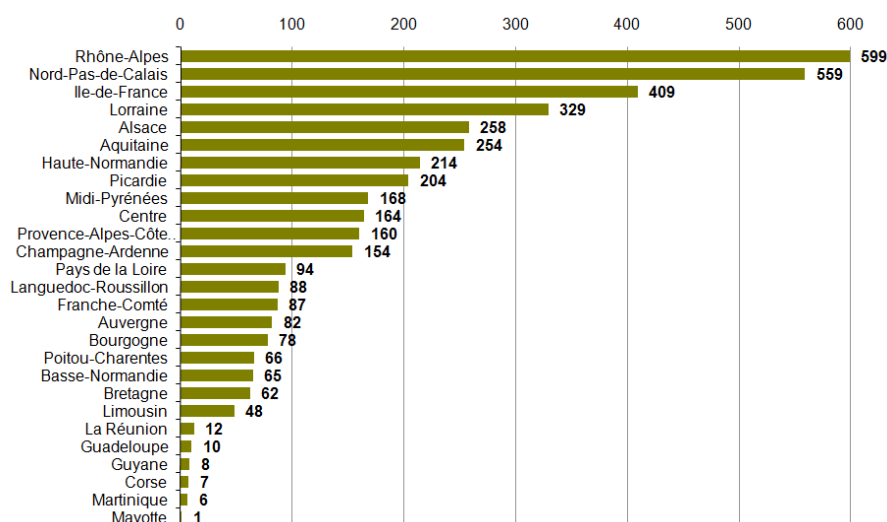


Figure I-9 : Nombre de sites et sols pollués par région en 2009 (MEDDTL - DGPR, 2009).

3.2. En Europe

La dégradation des sols touche l'ensemble de l'Union Européenne, celle-ci varie considérablement d'un État à l'autre et présente des menaces plus ou moins grave.

A l'heure actuelle, les pays européens n'ont pas d'inventaires complets des sites et sols pollués, cependant la législation de l'UE tend à obliger les États à identifier les sites contaminés. Les estimations du nombre de sites en Europe, présentant des activités potentiellement polluantes en activité ou à l'arrêt, se situent à environ 3 millions (Figure I-10) (EEA, 2007). Il convient de noter que près de 250 000 sites peuvent nécessiter un traitement urgent. Les principales causes de la contamination sont les activités industrielles et l'élimination et le traitement des déchets. Le nombre de sites pollués devrait croître à la fin des enquêtes initiées. Si les tendances actuelles se poursuivent, sans modification de la législation, les chiffres rapportés ci-dessus devraient augmenter de 50 % en 2025 (EEA, 2007).

Il existe des preuves de progrès dans l'assainissement des sites contaminés (Figure I-10), bien que l'évolution soit lente, environ 80 000 sites ont déjà été traités. Ces dernières années, de nombreux sites industriels ont tenté de modifier leurs procédés de production pour produire moins de déchets alors que la plupart des pays ont mis en place une législation de contrôle des déchets industriels et de prévention des accidents.

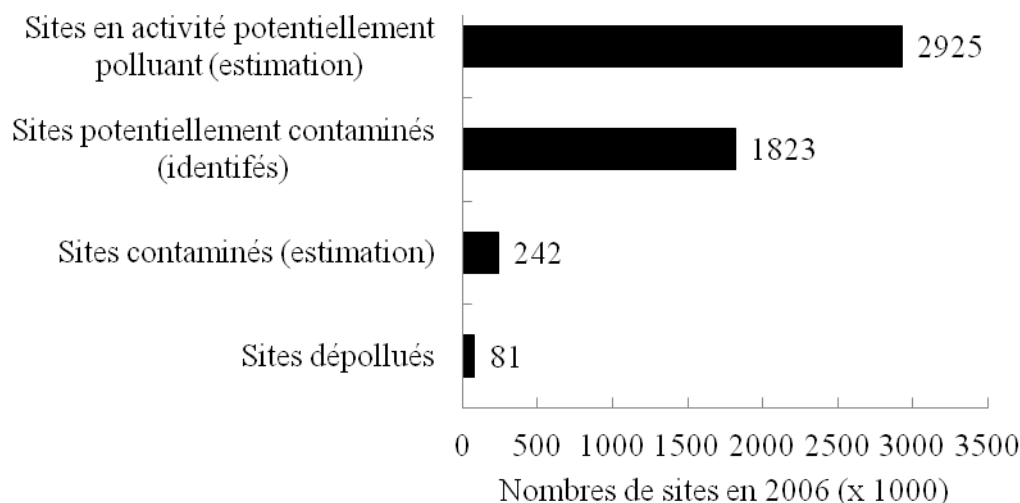


Figure I-10 : Inventaire des sites contaminés en Europe (EEA, 2007).

Chapitre II : L'arsenic dans le sol

1. Généralités

L'arsenic (As) est un composé ubiquiste présent naturellement dans les différents compartiments de la terre (hydrosphère, atmosphère, lithosphère et biosphère) à des concentrations généralement sans danger pour l'homme et l'environnement. L'origine anthropique de cet élément est souvent associée à l'activité minière, aux fonderies, à la fabrication industrielle de pesticides, ce qui en fait un polluant très répandu dans les sols.

A l'état natif, il existe sous trois formes allotropiques : jaune (α), noire (β) et grise (γ). La forme grise (γ) est la plus stable et la plus commune, elle cristallise dans le système rhomboédrique (Laperche, 2003). L'arsenic présente, dans ce cas, un aspect gris métallique, cassant. Il n'existe qu'un seul isotope stable de l'arsenic, ^{75}As (Onishi, 1969). L'arsenic appartient au groupe Va de la classification périodique des éléments qui regroupe également l'azote (N), le phosphore (P), l'antimoine (Sb), et le bismuth (Bi). Il possède des propriétés communes avec les éléments voisins, notamment avec le phosphore. Son électronégativité est trop élevée pour être considérée comme un élément métallique, c'est un métalloïde ou semi-métal. La chimie de l'As dans les sols est complexe, elle est fondée sur les propriétés de ses oxydes et sur leurs capacités à former des sels avec de nombreux cations (Cancès, 2004).

Cette complexité se matérialise par l'existence de plusieurs degrés d'oxydation ((-III), (0), (+III), (+V)), ainsi que la formation de liaisons de covalence stables avec le soufre, l'hydrogène et le carbone qui sont à la base d'une grande variété de composés organiques de l'arsenic d'origine naturelle ou industrielle (Matera, 2001 ; Laperche, 2003). Les formes majoritairement présentes dans les sols sont les arsénates (sel de l'acide arsénique, degrés d'oxydation (+V), As(V)) et les arsénites (sel de l'acide arsénieux, degrés d'oxydation +III, As(III)), le degré d'oxydation (-III) correspond à l'arsine (AsH₃) existant à l'état gazeux. Les propriétés physico-chimiques de l'arsenic sont présentées dans le Tableau I.5.

Tableau I.5 : Propriétés physico-chimiques de l'élément arsenic.

Numéro atomique	33
Masse atomique (g.mol⁻¹)	74,9216
Point de sublimation (°C)	613
Densité	5,73
Configuration électronique	[Ar]3d ¹⁰ 4s ² 4p ³
Valences	(+5) (+3) (0) (-3)
Rayons atomiques (Å)	
As ³⁺	0,58
As ⁵⁺	0,46

2. Origine et localisation

2.1. Origine naturelle de l'arsenic

Le transfert de l'arsenic dans les écosystèmes a plusieurs vecteurs naturels tels que l'érosion des roches, le lessivage des sols, les réactions d'oxydo-réduction, les précipitations, les hydrocarbures et l'activité volcanique. Cette dernière est considérée comme la principale source naturelle dans l'environnement, entre 2 800 et 8 000 t.an⁻¹ (Laperche, 2003). Cependant, Bhumbra et Keefer (1994) estiment que 99 % de l'arsenic total présent naturellement dans l'environnement est contenu dans les roches. Ceci peut s'expliquer par la capacité de cet élément à se substituer à la silice, à l'aluminium ou au fer dans les réseaux cristallins des minéraux silicatés (Chatain, 2004).

Dans les sols, la distribution de l'arsenic varie avec les caractéristiques pédochimiques en relation avec la nature de la roche mère (Smith *et al.*, 1998). En effet, les roches sédimentaires sont généralement plus riches en arsenic que les roches ignées et métamorphiques (Smedley et Kinniburgh, 2002). Dans les sols, les teneurs en arsenic varient de 2 à 40 mg.kg⁻¹ (Schultz et Joutti, 2007) et peuvent atteindre 1 000 mg.kg⁻¹ au niveau d'anomalies géochimiques, en particulier dans les roches sous-jacentes des zones à sulfures ou sulfoarséniures (arsénopyrites) (Barbier, 2001). Ces zones très riches en As correspondent à quatre environnements géologiques distincts (Barbier, 2001) :

- Les franges externes de certains granits intrusifs ;
- Les grandes fractures de plusieurs dizaines de kilomètres d'extension ;
- Les niveaux sédimentaires du début du Paléozoïque ;
- Les marges sédimentaires de certains massifs cristallins.

Plus de 200 espèces minérales comportant de l'arsenic, des arsénates, des arséniures, des sulfures et sulfosels, des arsénites ou des oxydes ont été identifiées (Smedley et Kinniburgh, 2002). Une liste des principaux minéraux arséniés est donnée dans le Tableau I.6.

Tableau I.6 : Principaux minéraux arséniés dans l'environnement (Wang et Mulligan, 2008)

Type	Présence	Exemple (nom, formule chimique)	
Arséniate	60 % des minéraux riches en As (O'Neill, 1995)	scorodite	FeAsO ₄ .2H ₂ O
		pharmacosidérite	Fe ₄ (AsO ₄) ₃ (OH) ₃ .6H ₂ O
		pharmacolite	CaHAsO ₄
Sulfure et sulfosel d'As	Stabilité en conditions réductrices, 20 % minéraux arséniés	arsénopyrite	FeAsS
		orpiment	As ₂ S ₃
		réalgar	AsS
Arsénite	Stabilité en conditions thermodynamiques restreintes	armangite	Mn ₃ (AsO ₃) ₂
		finnemanite	Pb ₅ (AsO ₃) ₃ Cl
Arséniure	essentiellement la métallurgie extractive	skutterudite	CoAs ₃
		löllingite	FeAs ₂
Oxyde d'As	Forte solubilité, forme principale de commercialisation	claudetite	As ₂ O ₃
		arsenolite	As ₂ O ₃

2.2. Sources anthropiques de l'arsenic

2.2.1. Activités minières

La pollution en As a longtemps été associée à l'extraction des minerais présentés dans le Tableau I.6. De nos jours, elle provient essentiellement du traitement des sous produits de l'extraction des minerais de Cu, Pb, Au et Ag auxquels ce métalloïde est souvent associé. De plus, il est souvent utilisé comme indicateur dans la prospection minière.

L'As, très présent dans les sols miniers, est généralement associé aux composés soufrés. Les minéraux soufrés, à l'état réduit dans le sous-sol, sont oxydés soit lors du processus de grillage, soit lorsqu'ils sont remontés à la surface en présence de O₂, d'eau et, le cas échéant, de bactéries sulfato-oxydantes (Laperche, 2003). Il en résulte, entre autres, l'oxydation de l'arsénopyrite (FeAsS) et de la pyrite (FeS₂). Cette oxydation conduit à une acidification du milieu, ainsi que, selon les réactions d'oxydation impliquées, à la libération de Fe²⁺, Fe³⁺, SO₄²⁻, de l'arsenic et des éléments associés à l'état de trace (Garelick *et al.*, 2008). L'As alors libéré peut suivre différentes voies et notamment être absorbé par les plantes, entraîné par les eaux de ruissellement lors de la lixiviation des sols, ou mobilisé et accumulé dans les horizons superficiels des sols (Matera, 2001).

Les contaminations des sols suite à une activité minière sont souvent localisées. Ceci entraîne de fortes concentrations en As à proximité des exploitations. En France, de nombreux sites font l'objet de suivis et/ou de travaux de dépollution, on peut citer notamment les mines de Salsignes dans l'Aude considérées comme l'un des sites les plus pollués en As, mais aussi de nombreux sites dans le Massif Central tels que le site minier d'Enguialès dans l'Aveyron, celui de la Petite Faille en Creuse ou encore les mines de charbon dans le bassin de Decazeville (Aveyron).

2.2.2. Activités industrielles

La demande d'As métallique reste limitée. L'essentiel de la production mondiale d'As, estimée à 52 000 tonnes en 2011 (Brooks, 2012), est sous forme de trioxyde d'arsenic (As₂O₃) ou "arsenic blanc", il représente 97 % de l'As produit en 2004 (Lauwerys *et al.*, 2007). Une grande partie des apports d'As dans les sols et l'environnement sont issus des industries du secteur primaire et secondaire. L'As a ainsi été utilisé dans l'agriculture. Les principales espèces arsénicales (Onken et Hossner, 1996 ; Baird, 1999) entrant dans la synthèse des produits phytosanitaires sont les suivantes :

- Insecticides : arséniate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$) et arséniate de plomb ($\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$) ;
- Défoliants : acide arsénique (H_3AsO_4), arséniate de sodium (Na_3AsO_4), arsénite de sodium (NaAsO_2) et acide diméthylarsinique (DMA : $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{H}$) ;
- Herbicides : acide monométhylarsinique (MMA : $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{H}_2$), monosodium méthaarsonate (MSMA : $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{HNa}$) et disodium méthaneearsonate (DSMA : $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{Na}_2$) ;
- Traitement du bois : le CCA est un mélange comportant de l'arsenic pentavalent (As_2O_5) associé à du chrome hexavalent (CrO_3) et à du cuivre bivalent (CuO).

Selon Fengxiang *et al.* (2003), ces produits ont largement été utilisés pendant une centaine d'années depuis 1860 jusqu'aux années 1940, date à partir desquelles ils ont connu une nette diminution voire une interdiction de leur utilisation depuis l'introduction sur le marché des pesticides organiques (Quazi *et al.*, 2011). Le CCA est encore utilisé dans certains pays pour le traitement du bois extérieur (Mandal et Suzuki, 2002). Cependant, fin 2003, suite à la décision des principaux acteurs de l'industrie du bois de cesser d'utiliser cet agent de conservation, la consommation d'arsenic dans le monde a été réduite de manière conséquente (Brooks, 2012). L'As et ses composés sont encore utilisés dans d'autres secteurs industriels parmi lesquels la pharmacie (synthèse de produits pharmaceutiques), l'électronique (composant de semi-conducteurs et en téléphonie mobile), la tannerie ou la métallurgie (agents durcisseurs du cuivre et du plomb) (Smith *et al.*, 1998).

En conclusion, il apparaît que les sources d'As les plus importantes sont les gisements sulfurés et, dans une moindre mesure, les activités industrielles. Les flux à partir de ces sources sont responsables des fortes concentrations enregistrées dans différents milieux (sédiment, sol, eau, atmosphère), l'As étant originellement peu concentré dans ces milieux.

3. Toxicité de l'arsenic

L'As est un oligoélément essentiel au métabolisme de certains organismes vivants (animaux, hommes, ...) (Jain et Ali, 2000). Les différentes formes de ce composé sont cependant considérées comme toxiques (Bissen et Frimmel, 2003). En effet, c'est le deuxième élément le plus dangereux après le plomb (Duker *et al.*, 2005).

La teneur en As ne constitue pas le paramètre essentiel qui permet d'évaluer la toxicité de cet élément pour les organismes vivants. En effet, les seuils de toxicité varient en fonction de l'organisme considéré, de la forme chimique de l'As, de son degré d'oxydation et de sa biodisponibilité dans le sol (Bose *et al.*, 2010). Il se démarque de nombreux éléments métalliques du fait que la plupart des composés organiques sont moins toxiques que ces composés inorganiques (Ventura-Lima *et al.*, 2011). Sous la forme inorganique l'As existe sous 4 degrés d'oxydation définissant différents niveaux de toxicité. Les arsénites sont plus toxiques, plus solubles et plus mobiles que les arsénates, principalement grâce à la capacité des arsénates à s'adsorber sur les minéraux du sol.

Par ordre croissant de toxicité, il a été rapporté l'ordre suivant (Geiszinger *et al.*, 2002) :

AsH₃ gaz, As (-III) > As (III) > As (V) > composés méthylés.

La DL₅₀ en mg.kg⁻¹ chez le rat de quelques dérivés de l'As après administration par voie orale est selon l'OMS (WHO, 2001) :

- Arsénite : 14 mg ;
- Arsénate : 20 mg ;
- MMA 700 à 1800 mg ;
- DMA 700 à 2600 mg ;
- Arsénobétaïne 10 000 mg.

Cependant, certaines études (Mass *et al.*, 2001 ; Hughes, 2002) tendent à contredire cet ordre de toxicité et démontrent que des espèces méthylées d'As trivalent peuvent être plus toxiques que les formes inorganiques.

La toxicité des ions arsénites As(III) et arsénates As(V) est liée à des mécanismes différents. Pour les ions arsénites, le principal effet toxique est associé à sa grande affinité pour les groupes sulfhydriles (SH) induisant une modification structurale des protéines à groupe sulfhydrile (Hughes, 2002, Wang *et al.*, 2004) et inhibant l'activité de plusieurs enzymes (Akter *et al.*, 2005). Ainsi, l'inhibition du complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase diminue la production d'ATP par un blocage du cycle de l'acide citrique (Tseng, 2004). La toxicité des ions arsénates est principalement due à leur transformation en arsénites. Ils peuvent également entrer en compétition avec les ions phosphates dans les réactions cellulaires et jouer le rôle de découpleur des phosphorylations oxydatives inhibant la synthèse de l'ATP (Bissen et Frimmel, 2003). Il interfère aussi avec le métabolisme glucidique (Akter *et al.*, 2005).

Les hommes sont exposés à l'As par plusieurs sources que sont l'air, l'eau, les aliments et le sol (Caussy, 2003). L'absorption des formes minérales de l'As est estimée à 95 % par voie orale (Zheng *et al.*, 2002). Elle est réalisée soit directement par la consommation des eaux contaminées, soit indirectement par la consommation d'aliments contaminés d'origines animales ou végétales (Hamadani *et al.*, 2010). L'inhalation est la seconde source de contamination. Elle se fait par l'inhalation de poussières ou de vapeurs d'arsine (AsH_3) et produit parfois des effets systémiques semblables à ceux associés à une absorption par voie orale. Toutefois, cela se produit rarement et les effets sont généralement bénins. L'As inhalé est bien plus susceptible d'occasionner un cancer des poumons. La voie cutanée, peu étudiée, est une voie mineure d'absorption : les quelques études disponibles rapportent des taux de pénétration percutanée inférieurs à 1 % (ATSDR, 2007).

La dose journalière conseillée pour l'homme est comprise entre 10 et 20 $\mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$ (Jacotot et Le Parco, 1999). Les intoxications à l'As peuvent être de nature aiguë ou chronique (Blaise *et al.*, 2007). En cas d'intoxication aiguë, les manifestations sont systémiques et prédominent au niveau respiratoire ou digestif selon la voie de contamination. Les symptômes se traduisent par une détresse respiratoire ou des vomissements intenses. Si la dose ingérée est supérieure à 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, la symptomatologie peut évoluer jusqu'au coma par œdème cérébral, voire entraîner la mort en quelques heures par défaillance multi-systémique. Si le patient survit à une intoxication aiguë, différents symptômes d'intoxication sont observés sur le plan dermatologique (dermite exfoliative) et interne (troubles sur le fonctionnement du système cardiovasculaire, des troubles digestifs, des troubles neurologiques, troubles hématologiques, ...). Les intoxications chroniques sont le reflet d'une exposition prolongée à de faibles doses d'As inorganique. Des signes cutanés sont les premières manifestations. Parmi ces troubles, le plus fréquent est appelé maladie des pieds noirs ou "blackfoot disease". Il se traduit par une diminution progressive des extrémités conduisant à une gangrène irréversible des extrémités. Les manifestations systémiques ont une latence très longue, jusqu'à 40 à 50 ans. Elles touchent les voies d'élimination de l'As. Il s'agit donc de tumeurs malignes bronchopulmonaires, urogénitales et hépatiques. Par ailleurs, des effets tératogènes et embryotoxiques ont été révélés (Bisson, 2010).

Cependant, malgré la toxicité des différents dérivés de l'As, il a été démontré une action particulièrement efficace du As_2O_3 dans le traitement d'une forme particulière de leucémie (Chen *et al.*, 1996 ; Jeanne *et al.*, 2010).

4. Forme et mobilité de l'arsenic dans le sol

La spéciation de l'As dans les sols peut être définie par son degré d'oxydation et ses différentes formes chimiques, leur localisation et leurs modes d'association avec les constituants du sol. Ces formes chimiques peuvent être variées et incluent notamment des phases minérales, des complexes d'adsorption sur les surfaces minérales et des complexes organométalliques (Cancès, 2004). Il est important de pouvoir pondérer la concentration totale en As d'un sol par sa spéciation car c'est le paramètre qui gouverne la solubilité, la migration, la disponibilité et donc la toxicité de l'As.

4.1. Les formes inorganiques

Dans l'environnement, l'As se rencontre principalement sous forme inorganique, il existe essentiellement sous quatre degrés d'oxydation différents : les arséniures (-III), l'As natif (0), les oxydes, sulfures, sulfoles et arsénites (+III) et les arsénates (+V). Les arsénates (As(V)) sont la principale phase minérale présente dans les sols (O'Neill, 1995). Ils présentent une grande solubilité dans l'eau et une capacité à changer d'états de valence suivant les conditions de pH et Eh du milieu (Joubert, 2008) (Figure I.11). L'As(V) s'observe dans les milieux oxydés tandis que l'As(III) s'observe dans les milieux faiblement réduits ($Eh > 100\text{mV}$) (Joubert, 2008) et l'As(0) élémentaire ainsi que As(-III) n'apparaissent que dans les milieux fortement réducteurs (Cappuyns *et al.*, 2002). Dans une gamme de pH de 4 à 8 classiquement rencontrée dans les sols, les espèces arséniées thermodynamiquement stables sont H_3AsO_3 et HAsO_2 pour l'arsénite et H_2AsO_4^- (domaine de stabilité entre pH 2 et 7) et HAsO_4^{2-} (thermodynamiquement stable pour des pH > 7) pour l'arséniate (Matera, 2001 ; Joubert, 2008). L'As à l'état d'oxydation +3 est présent en solution sous forme neutre, contrairement à l'As +5 qui est essentiellement rencontré sous la forme anionique.

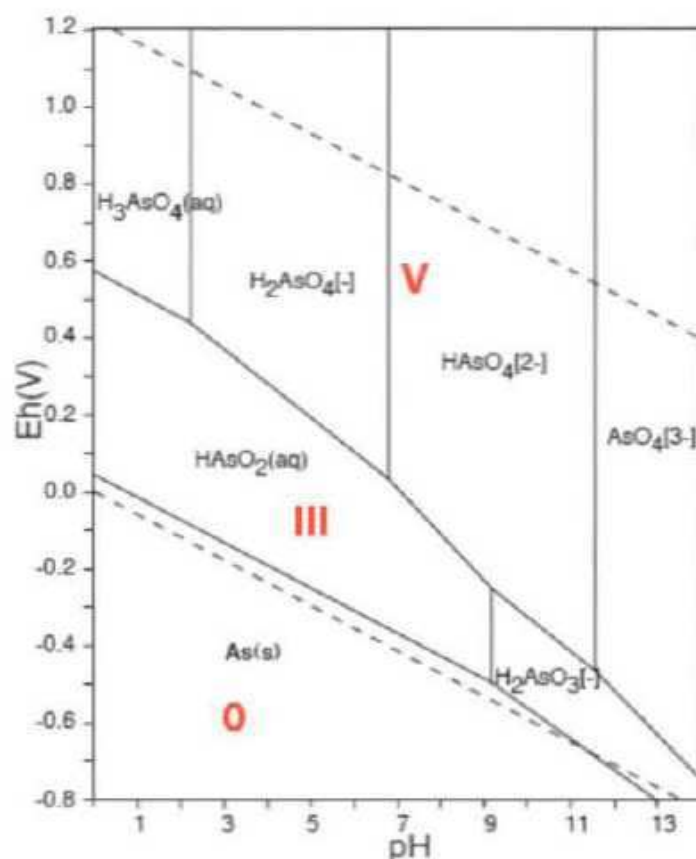


Figure I.11 : Diagramme Eh-pH du système As-O-H (10^{-10} mol.kg⁻¹ d'As et conditions standards de température et pression, Takeno, 2005).

Les sols contiennent des minéraux primaires arséniés issus directement de l'altération de la roche-mère du sous-sol (Tableau I.6). L'As est un élément chalcophile, qui se combine au soufre en donnant des sulfo-arséniures de Fe, Ni, Co ou Cu de part son association avec de nombreux métaux (Fe, Ni, Co ou Cu) (Laperche, 2003). Les espèces les plus fréquentes des minéralisations primaires sont l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (AsS), l'orpiment (As₂S₃) pour les minéraux soufrés mais aussi des arséniures tels que la niccolite (NiAs), la skutterudite (CoAs₃) la cobaltite (CoAsS), l'énargite (Cu₃AsS₄), l'allemontite (AsSb) et l'As natif (Lombi et Holm, 2010). L'As étant souvent associé aux dépôts de Au, Bi, Cd, Co, Fe, Hg, Mo, Ni, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, U, W et Zn, leur oxydation aboutit à la libération de l'As dans le milieu naturel (Chatain, 2004). Selon les conditions physico-chimiques du système, l'As peut se retrouver piégé au sein de minéraux secondaires (Bhattacharya *et al.*, 2007).

L'adsorption et la coprécipitation sont les mécanismes les plus cités en ce qui concerne l'atténuation de la disponibilité de l'As dans le sol (Sracek *et al.*, 2004). En milieu oxydé, les oxydes de Mn, de Fe et Al sont considérés comme étant les principaux composés solides

contrôlant l'adsorption de l'As dans les sols (Sracek *et al.*, 2004, Lombi et Holm, 2010). L'affinité pour l'adsorption sur l'oxyhydroxyde de Fe(III) serait plus forte pour l'As (V) à un pH compris entre 4 et 5 et pour l'As(III) à des pH plus élevés compris entre 6 et 8 (Stollenwerk, 2003). La réduction de l'As (V) en As (III) a été observée au niveau de la zone de transition aérobie-anaérobie dans les sédiments des lacs et dans les sols (Dictor *et al.*, 2004).

La rétention de l'As dans les sols souffre de la compétition avec plusieurs espèces anioniques telles que les ions carbonates (Garcia-Sanchez *et al.*, 2005) ou phosphates (Goh et Lim, 2004 ; Sracek *et al.*, 2004). Concernant la compétition des ions carbonates pour les sites d'adsorption de l'As, Radu et son équipe (2005) montrent la faiblesse de l'effet de compétition comparé à celui des ions phosphates qui présentent un comportement chimique voisin de l'arséniate. Par ailleurs, Sadiq (1997) a observé un rôle majeur joué par les carbonates de calcium dans l'adsorption de l'As en milieu alcalin. Selon Wenzel *et al.* (2001), le calcium a, dans ce cas, un effet significatif sur la fixation de l'As.

Il existe de très nombreuses études montrant les possibilités de coprécipitation de l'As. En milieu oxydant, l'arséniate prédomine, il coprécipite avec des oxyhydroxydes de Fe mais aussi de Mn et d'Al (Akai *et al.*, 2002 ; Cancès *et al.*, 2005). En milieu réducteur, c'est l'arsénite qui domine sous forme soluble, il peut précipiter en présence de soufre (telle que la pyrite) pour former des sulfures (arsénopyrite, FeAsS). Ainsi, la réduction des oxyhydroxydes de Fe associés à l'As ou l'oxydation de l'arsénopyrite entraînant la solubilisation de ces solides, peuvent avoir des conséquences dramatiques sur la libération de l'As dans l'environnement (Bandyopadhyay *et al.*, 2004 ; McArthur *et al.*, 2004 ; Wang et Mulligan, 2006). L'As apparaît donc comme un polluant au comportement anionique, dont la mobilité sera fortement conditionnée par l'état d'oxydoréduction du milieu, souvent en relation avec la présence du soufre (Girouard et Zagury, 2009).

Les recherches sur l'influence de la matière organique (MO) sur la mobilité de l'As inorganique présentent des données contradictoires (Kumpiene *et al.*, 2007). La MO dissoute peut entrer en compétition pour les sites d'adsorption des oxydes de Fe (hematite) et induire le relargage de l'As(V) et de l'As(III) (Redman *et al.*, 2002). Cao et Ma (2004) et Juwarkar *et al.* (2008) observent une adsorption de l'As par la MO mais Fitz et Wenzel (2002) concluent qu'il n'y a aucune preuve d'une contribution de la MO dans les processus de sorption d'une importante part de l'As. Enfin, les travaux de Mench *et al.* (2003), Van Herwijnen *et al.* (2007) et Beesley *et al.* (2010) montrent une augmentation de la lixiviation de l'As sur un sol amendé par du compost. Sur des sites pollués en As, une solubilité accrue de ce métalloïde

dans les horizons organiques de surface de sols forestiers a également été reportée (Brandstetter *et al.*, 2000 ; Wenzel *et al.*, 2001). Par ailleurs, Farrell *et al.* (2010) ont mis en avant que l'apport de compost sur un sol pollué entraîne une augmentation du pH, améliore la teneur en matière organique et diminue la lixiviation des métaux et métalloïdes. Toutes ces observations auraient un effet bénéfique sur le développement et l'enracinement des plantes et faciliteraient la revégétalisation d'un sol contaminé. L'effet du pH sur la MO (Shiralipour *et al.*, 2002) et le type de MO (Beesley *et al.*, 2010) pourraient jouer un rôle dans ces résultats contradictoires de l'influence de la MO sur la mobilité de l'As.

4.2. Les formes organiques

Les formes organiques de l'As co-existent dans les sols à la fois sous des états trivalents et pentavalents. Cependant, les espèces pentavalentes telles que les acides monométhylarsonique ($\text{CH}_2\text{AsO}(\text{OH})_2$, MMA^{AsV}), diméthylarsinique ($((\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}))$, DMA^{AsV}) et l'oxyde de triméthylarsine ($((\text{CH}_3)_3\text{AsO})$, TMAO), sont plus largement retrouvées que les espèces trivalentes, telles que l'acide monométhylarsineux ($\text{AsCH}_3(\text{OH})_2$, MMA^{AsIII}) et l'acide diméthylarsineux ($\text{As}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$, DMA^{AsIII}) (Quemeneur, 2008), qui ont tendance à être rapidement oxydées (Laperche *et al.*, 2003). Les méthylations successives de l'arsine conduisent à la formation de composés très volatils tels que monométhylarsine ($\text{H}_2\text{CH}_3\text{As}$, MMA), le diméthylarsine ($((\text{CH}_3)_2\text{HAs}$, DMA) et le triméthylarsine ($((\text{CH}_3)_3\text{As}$, TMA) (Quemeneur, 2008).

Les réactions de méthylation sont réalisées par les micro-organismes telluriques et dépendent des espèces arséniées présentes et des conditions physico-chimiques du milieu (Smith *et al.*, 1998). La présence de composés organiques peut être aussi le résultat d'un apport anthropique principalement agricole (pesticides, fertilisants...) (Quazi *et al.*, 2011).

Les formes organiques de l'As dans les sols semblent généralement présentes en très faible quantité (Sarkar *et al.*, 2007 ; Huang et Matzner, 2007) et les processus de sorption des composés organiques de l'As dans le sol n'ont pas été étudiés jusqu'ici (Huang et Matzner, 2007).

Chapitre III : L'arsenic et les plantes

Selon Bourrelier et Berthelin (1998), la phytodisponibilité d'un élément trace peut-être définie comme la quantité d'élément qui peut-être prélevée par la plante durant son développement. Parmi l'ensemble des ETM, une vingtaine sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse, les processus moléculaires ou l'assimilation des macronutriments (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Pour autant, les éléments traces n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante. En effet, certains restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les éléments non essentiels pour les plantes et souvent toxiques, As, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Pour l'As, les teneurs mesurées dans différentes espèces végétales cultivées sur des sols naturels varient de 0,01 à 10 mg.kg⁻¹ (Matschullat, 2000).

L'As est donc un élément phytotoxique, de faibles teneurs dans le sol peuvent entraîner des perturbations dans le développement et le fonctionnement des végétaux. Des effets toxiques ont été observés chez les plantes pour des concentrations en As dans les feuilles de 5 à 20 mg.kg⁻¹ MS (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Les réponses biochimiques des plantes vis-à-vis de l'As sont complexes. En effet, les espèces végétales montrent un large éventail de sensibilité aux différentes formes chimiques de l'As. Leur sensibilité/tolérance dépend à la fois de facteurs biologiques liés à la plante mais aussi de la teneur et de la spéciation chimique de l'As dans l'environnement. L'As peut causer des effets à court et à long terme dans les plantes, ceux-ci sont dépendants de l'espèce végétale et du temps d'exposition. Il peut notamment provoquer une inhibition de la croissance, de l'activité photosynthétique, une altération de l'ADN et entraîner la sénescence et la mort cellulaire (Rahman *et al.*, 2007).

1. Transfert de l'arsenic du sol vers les plantes

L'absorption de l'As et sa translocation dans les parties aérienne sont très variables et dépendent de la plante (espèce végétale, écotype, stade de développement) et des propriétés du sol (forme chimique de l'arsenic, pH, potentiel d'oxydo-réduction, température du sol, quantité de matière organique, conditions de drainage) (Bisson, 2010).

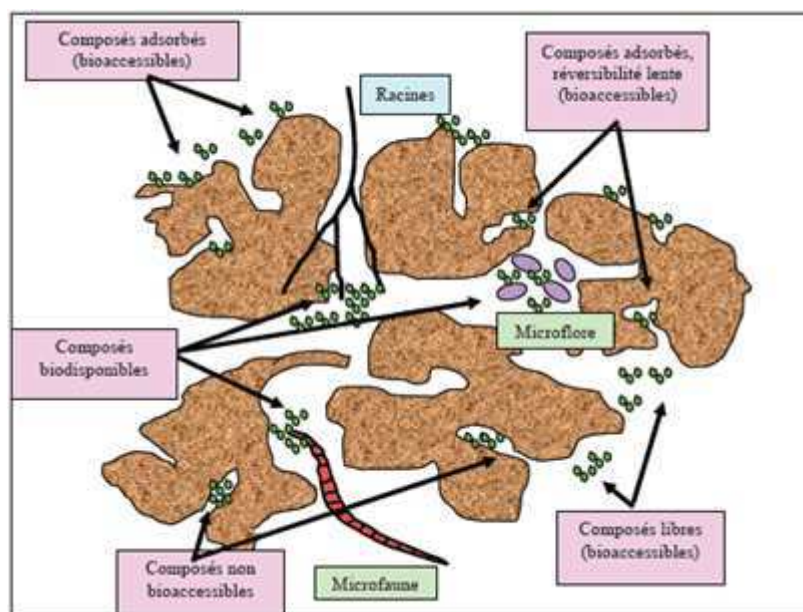


Figure I.12 : Schéma représentant les fractions bioaccessibles et biodisponibles du contaminant dans un sol (Semple *et al.*, 2004).

1.1. Disponibilité de l'arsenic dans le sol

Différentes formes chimiques de l'As co-existent sous la forme de cations et d'anions libres, de complexes minéraux neutres, de formes organo-métalliques solubles ou de formes méthylées (MMA, DMA, TMAO et TMA) (Bisson, 2010). Les formes solides de l'As, sont très majoritaires et en quantité dans le sol. Sur la phase solide, l'As peut-être réparti en deux compartiments : les ions pouvant passer en solution et donc faiblement adsorbés aux fractions solides du sol et les composés non mobilisables.

Les formes solubles, bien que minoritaires, ont un rôle prépondérant, puisque les racines des plantes prélèvent l'As uniquement dans la solution du sol (Clemens *et al.*, 2006). En effet, seul l'As disponible présent sous forme d'espèces ioniques dans la solution du sol ou adsorbé aux constituants du sol peut-être assimilé par le système racinaire de la plante (Tremel-Schaub et Feix, 2005) (Figure I.12). Cette fraction montre généralement une variabilité spatio-temporelle bien plus importante que la concentration totale en As (Figure I.13).

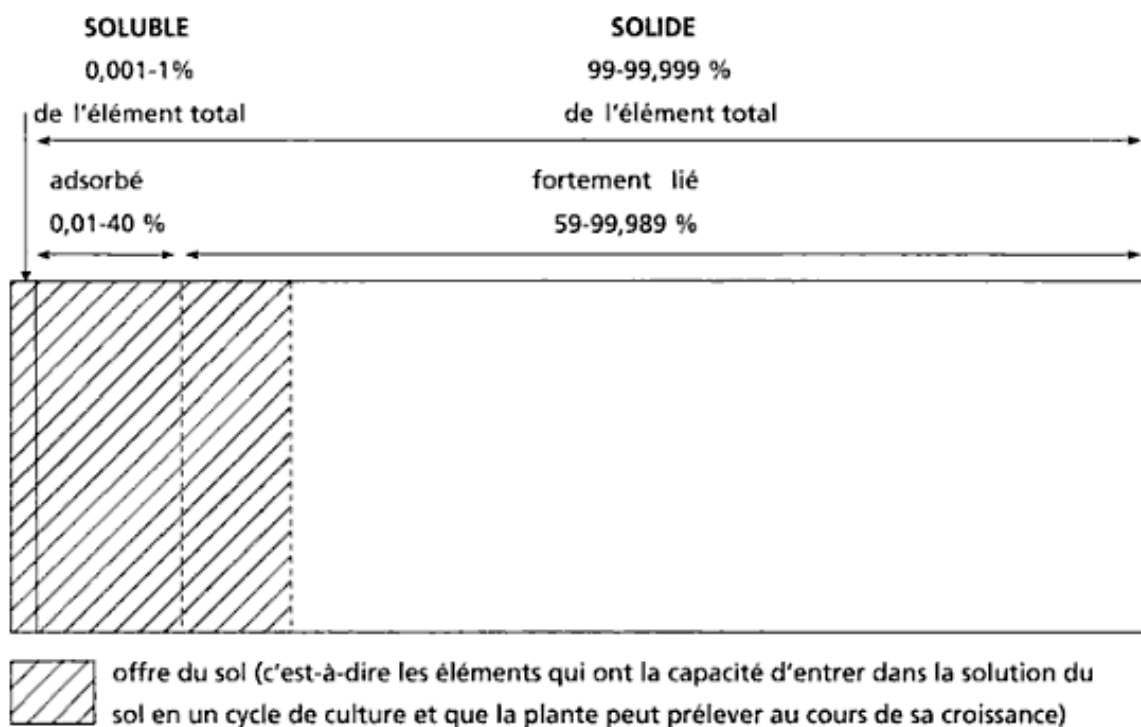


Figure I.13 : Répartition d'un élément trace dans les différentes phases du sol à un instant T (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

Cette variabilité est dépendante des paramètres physico-chimiques du sol (texture, pH, CEC, Eh, température), de l'activité de la microfaune et de la microflore du sol et de l'activité racinaire des végétaux (Babula *et al.*, 2008). Ces facteurs contrôlent les processus favorables à la présence d'As soluble dans la solution du sol qui sont la dissolution, la désorption et la complexation (Sharma et Sohn, 2009). En effet, l'As, connu pour avoir une forte affinité pour les surfaces d'oxydes (Chatain, 2004), présente une fraction soluble le plus souvent contrôlée par des réactions de complexation de surface sur les oxydes / hydroxydes du Fe et dans une moindre mesure de l'Al et du Mn (Inskeep *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les pH très acides (< 5) ou basiques (> 8) favorisent le prélèvement de l'As par les plantes (Tremel-Schaub et Feix, 2005). De même, la valence de l'As conditionne son absorption par les plantes. Chez la tomate (*Lycopersicum esculentum*), le prélèvement des ions arsénites est plus importante que celui des ions arsénates (Burlo *et al.*, 1999).

Les micro-organismes du sol jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique de l'As, ils peuvent accroître ou diminuer sa mobilité ou sa disponibilité (Bisson, 2010). En effet, ils peuvent permettre la réduction ou l'oxydation des composés arséniés. Selon Quemeneur (2008), certaines bactéries utilisent l'arséniate comme accepteur d'électrons, il s'agit des

bactéries AsV réductrices avec notamment les *enterobacters sp.* ou les *Bacillus sp.* D'autres peuvent oxyder l'arsénite en arséniate, les bactéries AsIII oxydantes, représentées principalement par le phylum *Proteobacteria* tel que les *pseudomonas sp.* et les *agrobacterium sp.* (Quemeneur, 2008). Elles peuvent intervenir indirectement pour libérer l'AsV adsorbé ou co-précipité sur les oxy-hydroxydes de Fe en réduisant les ions FeIII, en respirant l'AsV ou en couplant ces deux actions (Oremland et Stolz, 2005). De même, l'oxydation du soufre, ou du FeII par des bactéries FeII oxydantes (tel que *Leptothrix sp.* et *Leptospirillum sp.*) entraîne la libération d'AsIII (Figure I.14) (Quemeneur, 2008). Enfin certains champignons ou bactéries sont capables de méthyler l'As généralement en conditions anaérobies. Ces processus sont influencés par la température, l'humidité, le pH et la teneur en oxygène du milieu (Quemeneur, 2008).

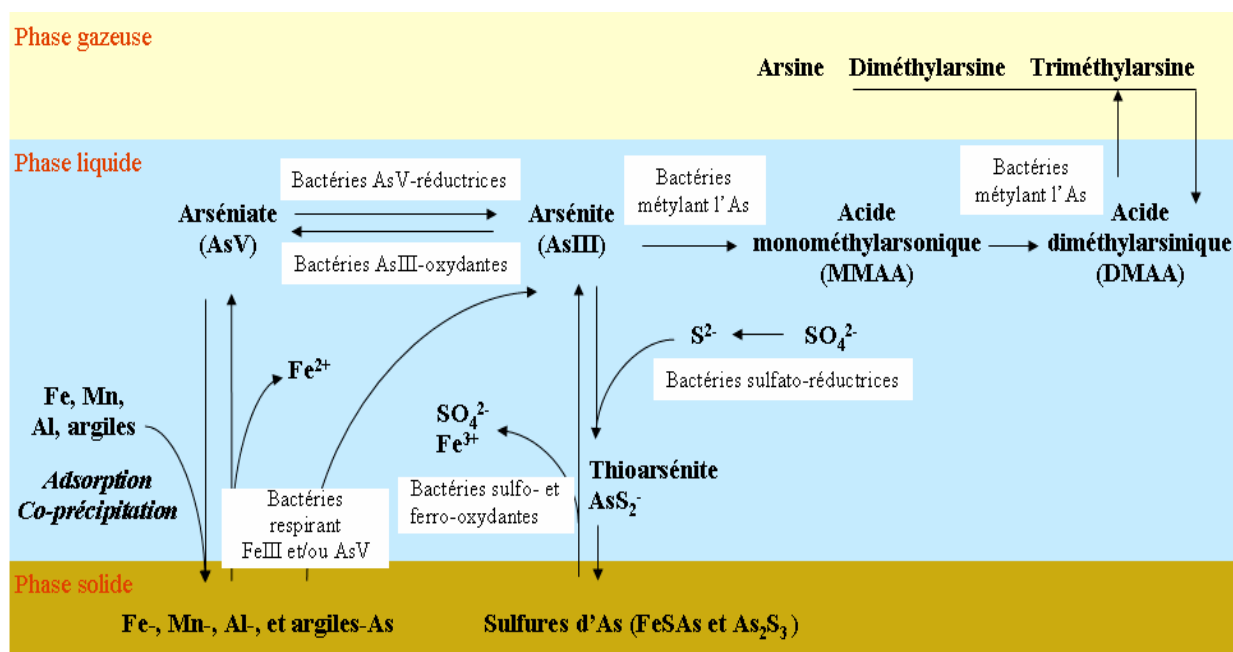


Figure I.14 : Cycle biogéochimique de l'As (adapté de Nicholas *et al.*, 2003)

Différentes études (Avidano *et al.*, 2005 ; Pepi *et al.*, 2007) ont tenté de caractériser les communautés microbiennes de sols contaminés par l'As. Ces travaux ont montré que les familles *Pseudomonaceae* et *Bacillaceae* dominent et que la structure de la communauté bactérienne et non sa densité est modifiée par la présence d'As.

Ainsi les bactéries jouent un rôle important dans les processus de mobilisation et de transfert de l'As dans les différents compartiments environnementaux.

1.2. Absorption racinaire de l'arsenic

La rhizosphère est une zone dynamique qui résulte d'interactions complexes et de processus interactifs multiples (Darrah *et al.*, 2006). En effet, l'architecture de la racine et son métabolisme, la disponibilité en eau et en nutriments, les exsudats racinaires, les associations fongiques et bactériennes (Gahoonia et Nielsen, 2003) sont l'ensemble des composants qui constituent un système dynamique complexe au niveau rhizosphérique (Citeau, 2008).

Les éléments en solution dans le sol sont transférés vers la zone rhizosphérique par deux processus, le transfert passif et le flux de masse (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Le prélèvement des ETM par la racine peut se faire de 2 façons différentes (Capilla, 2005) :

- L'absorption passive des ions métalliques suivant un gradient électrochimique. Cette absorption peut dans certains cas nécessiter une dépense d'énergie pour rétablir le gradient électrochimique (fonctionnement d'une pompe à protons) ;
- L'absorption active est spécifique et nécessite une fourniture d'énergie et l'intervention d'une protéine de transport.

L'importance de chacune des voies d'absorption est fonction de la concentration externe en ETM (Duquesnoy, 2009).

1.2.1. Absorption de l'arséniate

Comme il a été précisé précédemment (chapitre I.2.1), l'As(V) possède des propriétés physiques et chimiques proches du phosphate. Bennett et Malamy (1970) sont les premiers à avoir émis l'hypothèse que les transporteurs de phosphate permettaient l'assimilation d'As. En effet, ils ont observé que certaines souches bactériennes, de l'espèce *Escherichia coli*, présentant des transporteurs de phosphate défectueux, accumulent moins d'As et tolèrent cet élément. Chez les plantes, de nombreux travaux (Tripathi *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2011) ont confirmé que l'arséniate était principalement absorbé *via* les transporteurs du phosphate. Ce mécanisme d'absorption est un co-transport mettant en jeu un ion d'arséniate et deux protons (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989). Chez *Arabidopsis thaliana*, PHT1.1 et PHT1.4 sont deux transporteurs qui jouent un rôle majeur dans l'acquisition du phosphate (Jana, 2009), le double mutant *pht1.1Δ4Δ* est plus résistant à l'arséniate que le sauvage. Par ailleurs, une récente étude (Abercrombie *et al.*, 2008) a montré que l'espèce, *Arabidopsis thaliana*, était capable de réguler l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du phosphate pour limiter l'absorption d'arséniate. D'autre part, selon les travaux de Tu *et al.* (2004), la présence de phosphore a directement un impact sur la phytodisponibilité de l'As dans le sol et entraîne

une diminution de l'absorption de l'AsV. Celle-ci peut expliquer une diminution de la toxicité de l'AsV sur la croissance des plantes en présence de phosphore observée lors d'une étude réalisée sur deux espèces végétales, *Medicago truncatula* et *Hordeum vulgare*, par Christophersen *et al.* (2009).

L'As(V) est donc en compétition avec le phosphate au niveau de l'absorption racinaire et peut interférer dans les processus métaboliques liés à la synthèse d'ATP et à la phosphorylation oxydative (Meharg et Hartley-Whitaker, 2002 ; Tripathi *et al.*, 2007).

1.2.2. Absorption de l'arsénite

Jusqu'en 1996, les scientifiques pensaient que l'arsénite (As(III)) entraînait dans les cellules par diffusion passive en suivant les composés organiques non ionisés tels que les acides aminés. En 1997, l'équipe de Sanders remarqua que la souche bactérienne mutante *glpF* présentait une tolérance à l'arsénite supérieure par rapport à la souche sauvage. C'est ainsi que fut mis en évidence le rôle de l'aquaglycéroporine GlpF (Glycerol facilitator) dans l'absorption de l'arsénite chez les plantes confirmé par la suite par de nombreuses études (Bienert, 2008 ; Isayenkov et Maathuis, 2008). Les aquaglycéroporines sont une sous-famille de la superfamille des aquaporines (Fu et Min, 2007). Ces canaux sont présents au niveau du système racinaire et permettent le transfert des nutriments et des solutés dans la racine. D'autres études portant sur les bactéries et les levures ont suivi et ont également montré que ce type de protéines était impliqué dans le transport de l'arsénite (Bhattacharjee et Rosen 2007).

Isayenkov et Maathuis (2008) ont mis en évidence un contrôle du transport de l'arsénite par le gène *AtNIP7.1*. En effet, des mutants d'*Arabidopsis*, n'exprimant pas le gène *NIP7.1*, présentent une meilleure résistance à l'arsénite et en accumulent 25 % de moins que les *Arabidopsis* sauvages. De même, l'expression de ce gène chez la levure augmente la sensibilité de cette dernière à l'arsénite. D'autres études (Ma *et al.*, 2008 ; Briat, 2010) ont montré que l'arsénite utilise les voies de transport du silicium pour pénétrer dans les cellules de l'épiderme et de l'endoderme racinaire, notamment en raison de leurs pKa proches et de leur structure tétraédrique d'encombrement similaire.

1.2.3. Absorption des composés organiques de l'arsenic

Les travaux de Rahman et de ses collaborateurs (2007) ont mis en évidence un flux d'As méthylé sous forme MMA et DMA à un niveau moindre en comparaison à celui de l'arsénite ou de l'arséniate. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs études réalisées sur différentes espèces végétales et démontrant une absorption de MMA et DMA à partir de

solutions hydroponiques (Abedin *et al.*, 2002 ; Rahman *et al.*, 2011), y compris chez l'espèce hyperaccumulatrice d'As, *Pteris vittata* (Ma *et al.*, 2001). L'absorption de l'As méthylé s'effectuerait également par les aquaglycéroporines et les transporteurs du silicium (Briat, 2010). Cependant, il est également possible que la méthylation de l'As s'effectue dans la plante (Meharg et Hartley-Whitaker, 2002), ce qui peut-être un biais à l'évaluation de l'absorption de l'As méthylé chez les plantes.

1.3. Translocation, détoxification et stockage de l'arsenic

Une fois absorbée par les racines, une part plus ou moins importante de l'As sera transférée au sein des différents organes de la plante. Sa détoxification, sa translocation et son stockage au sein de la plante sont modulés par des déterminants physiologiques et biochimiques et reposent principalement sur deux mécanismes, la chélation et la compartimentation (Meharg et Hartley-Whitaker, 2002). Ainsi, la présence intracellulaire de ligands organiques assure une complexation et permet de réduire la toxicité de nombreux ions métalliques et métalloïdes. Elle constitue un aspect fondamental de la résistance des plantes aux ETM. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés.

1.3.1. Les métallothionéines (MT)

Les métallothionéines sont des protéines largement distribuées dans le monde vivant, elles sont présentes chez de nombreux procaryotes et chez la plupart des eucaryotes. Ces protéines sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques (essentiellement Cu et/ou Zn) et par leur forte proportion de résidus cystéines (environ 30 %) (Hassinen, 2009). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés) et par l'absence de résidus aromatiques (Rauser, 1999). Selon les études actuellement disponibles (Rauser, 1999 ; Domènech *et al.*, 2006), la plupart des MT présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition. Chaque domaine est responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents (Cobbett et Goldsbrough, 2002). Les plantes produisent des MT de classe II (MT-II), qui diffèrent de l'archétype de mammifères MT-I dans la localisation et le nombre de cystéines (Rauser, 1999). Le rôle précis des MT dans la réponse à l'As est encore débattu, mais de nombreuses observations ont montré qu'elles pourraient être impliquées dans certains mécanismes de tolérance. En effet, des travaux menés chez

Arabidopsis thaliana et *Lycopersicon esculentum* (Grispen *et al.*, 2009 ; Goupil *et al.*, 2009) ont démontré que la présence d'As inorganique stimule la biosynthèse des MT et que celles-ci augmentent le transfert de l'As vers les parties aériennes. Cependant, la synthèse de MT ne constitue probablement pas une réponse spécifique. En effet, la présence universelle des métallothionéines dans le monde vivant (chez les organismes sensibles comme chez les résistants) et leur synthèse dans des situations variées, suggèrent que ces protéines seraient plutôt impliquées dans le contrôle général de l'homéostasie cellulaire et non dans les réponses spécifiques aux ETM (Domènech *et al.*, 2006, Sigel *et al.*, 2009).

1.3.2. Les phytochélatines (PC)

Elles représentent le deuxième groupe de chélateurs intracellulaires, essentiellement rencontrées dans le règne végétal. De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux MT, avec lesquelles elles partagent des similarités de structure et de fonction : elles sont très riches en Cys [formule générale (y-Glu-Cys) n-Gly (n = 2 à 11)] (Clemens, 2006) et leur synthèse est stimulée par l'exposition à divers ions métalliques et métalloïdes. Cependant, l'origine biosynthétique des PC marque une différence essentielle avec les MT (Pal et Rai, 2010). En effet, elles ne sont pas directement codées par le génome mais sont synthétisées par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly) (Figure I.15) (Picault *et al.*, 2006). De nombreuses études (Zhang *et al.*, 2005, Inouhe, 2005 ; Picault *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Requejo et Tena, 2012) ont mis clairement en évidence l'implication des PCs dans les mécanismes cellulaires régulant l'adaptation/tolérance aux ETM chez les plantes supérieures. Ces travaux ont montré une augmentation de la production de PC couplée à une réduction importante des teneurs en glutathion réduit (GSH), intervenant dans la synthèse de PC, en réponse à l'exposition aux ions métalliques et métalloïdes chez différentes espèces végétales. Ce phénomène est observé pour des plantes exposées à l'As (Tripathi *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Requejo et Tena, 2012). En effet, la complexation de l'AsIII avec les PC dans les racines réduit la toxicité de l'arsénite et permet sa séquestration dans les vacuoles racinaires (Briat, 2010). Comme pour les MT, les PC jouent donc un rôle important dans la tolérance des plantes à l'As en permettant sa détoxification par complexation.

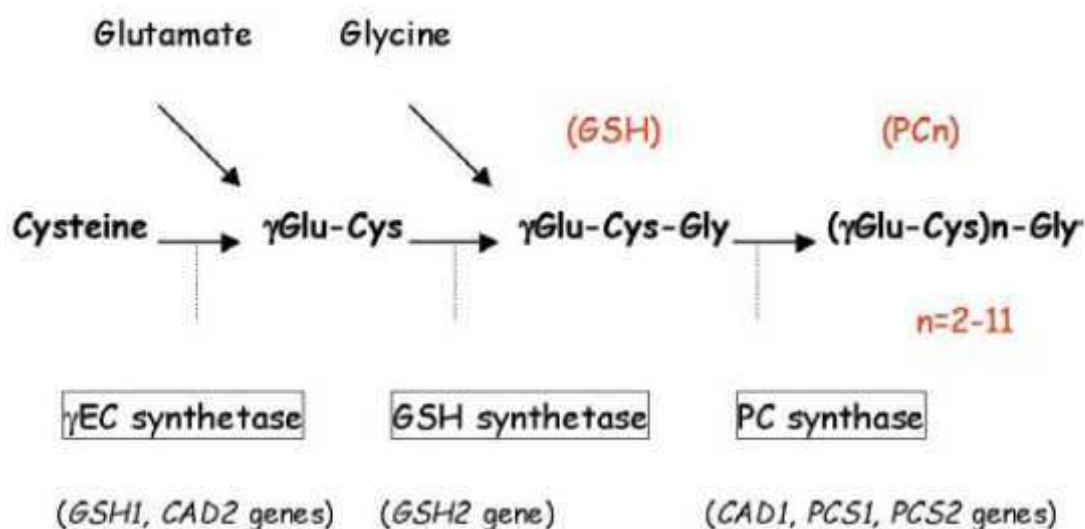


Figure I.15 : Biosynthèse des PC chez les plantes supérieures (Inouhe, 2005).

1.3.3. Métabolisation de l'arsenic

Ce mécanisme de détoxification induit la transformation de l'As de la forme inorganique à des formes organiques tels que MMA, DMA, les ions tetramethylarsonium (TETRA) et oxydes de trimethylarsonium (TMAO). Ce métabolisme est connu chez des microorganismes et reste peu exploré chez les végétaux supérieurs. D'autres voies métaboliques permettent la formation de métabolites tels que des sucres arséniés, de l'arsénobétaïne et de l'arsenocholine (Tamaki et Frankenberger, 1992). Ces composés ont été également détectés chez des végétaux supérieurs (Kuehnelt *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont montré la présence de cette voie de méthylation de l'As qui permet une réduction significative de la toxicité des formes inorganiques de l'As chez les plantes (Koch *et al.* 2000 ; Kuehnelt *et al.*, 2000).

1.3.4. Compartimentation de l'arsenic

Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des contaminants métalliques et métalloïdes sous forme ionique dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques (Briat, 2010) (Figure I.16). Cette hypothèse est étayée par des travaux de Zhao et ses collaborateurs (2009) sur l'As. Ils ont mis en évidence une réduction des ions arsénates en arsénites dans les racines grâce à l'arséniate réductase, et au pouvoir réducteur du glutathion. Les ions arsénites sont ensuite complexés à des phytochélatines ce qui permettrait leur séquestration dans les vacuoles racinaires *via* des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) localisés sur les tonoplastes des vacuoles (Song *et al.*, 2010 ; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2010).

Ceci atteste du rôle prépondérant de la vacuole dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en présence d'un excès en As. Ce phénomène expliquerait le faible taux de translocation de l'As vers les parties aériennes des plantes observé chez de nombreuses espèces végétales (Jana, 2009).

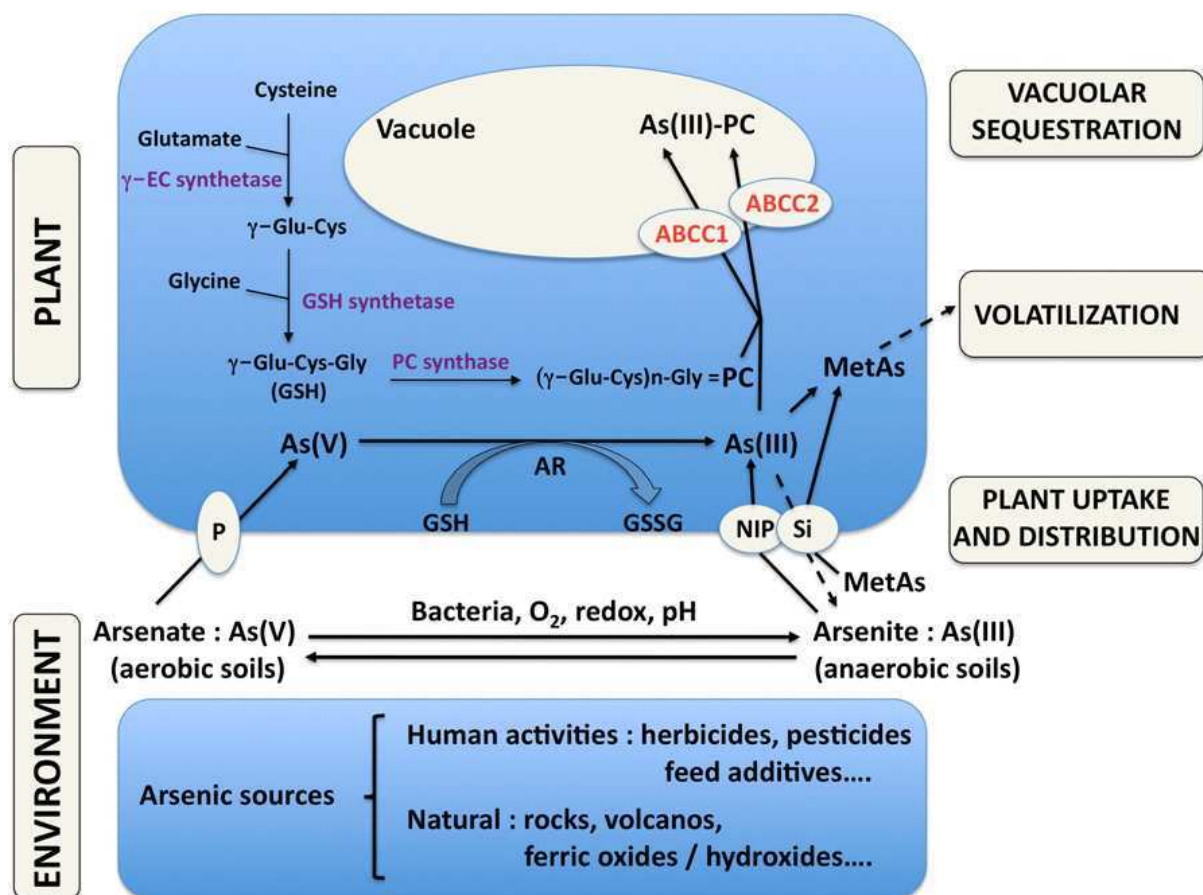


Figure I.16 : Schéma des mécanismes possibles de l'absorption, de la détoxification et du stockage de l'As dans les racines de plantes (d'après Briat, 2010).

Ainsi, à l'exception des plantes hyperaccumulatrices, entre 75 et 90 % de l'As absorbé se concentre dans les racines. Une étude intégrant 46 espèces végétales a montré que le rapport entre la quantité d'As présente dans les feuilles et celle présente dans les racines était compris entre 0,01 et 0,9 avec une médiane à 0,09 (Raab *et al.*, 2007). Une des hypothèses avancée serait que l'As se fixe largement sur les parois cellulaires (Fitz et Wenzel, 2002). D'autre part, comme précisé précédemment, une part importante de l'AsV absorbé au niveau des racines est réduit en AsIII (Pickering *et al.*, 2000 ; Fitz et Wenzel, 2002). Les ions arsénites sont ensuite complexés à des PC permettant leur détoxification et leur stockage dans les vacuoles racinaires, limitant ainsi leur translocation vers les parties aériennes. Cependant, une

étude menée par Dhankher *et al.* (2006) sur *Arabidopsis thaliana* semble indiquer l'existence d'un transfert de l'AsV vers les parties aériennes *via* le xylème par l'intermédiaire des transporteurs de phosphate. En effet, ces travaux ont montré qu'en l'absence de réduction de l'arséniate en arsénite au niveau des racines le facteur de translocation entre les parties aériennes et racinaires était de 0,025 contre 0,01 chez le phénotype sauvage où le gène AtACR2 (Arsenic Compounds Resistance, permettant la réduction des As(V) en As(III)) s'exprimé. Par ailleurs, Bleeker *et al.* (2006) ont identifié, chez cette même espèce, des protéines de types CDC25, similaire à ACR2 (AtASR). Lors de la surexpression du gène AtASR chez *Arabidopsis thaliana*, une rétention de l'As dans le système racinaire a été observée. Il en ressort que la forme As(III) est moins mobile vers les parties aériennes que la forme As(V) (Bleeker *et al.* 2006). Au final, ces données montrent que les plantes favorisent une stratégie de complexation pour diminuer la phytotoxicité de l'As. La Figure I.16, extraite d'un article publié par Briat (2010), présente une synthèse de l'ensemble des mécanismes d'absorption et de stockage de l'As.

Concernant les espèces hyperaccumulatrices d'As comme *Pteris vittata*, elles mobilisent facilement l'As vers le xylème (Su *et al.*, 2008). D'après Zhang et ses collaborateurs (2002), cette espèce est capable de transférer une part importante de l'AsIII, entre 60 et 74 %, vers ses parties aériennes. Cependant, une étude plus récente de Zhang *et al.* (2004) semble indiquer la présence d'un complexe arsénié inconnu autre que AsIII-PC dans les frondes de *P. vittata*, ce complexe serait sensible à la température et aux ions métalliques et insensible au pH. Par ailleurs, le riz (*Oriza sativa*) présente un facteur de translocation vers les parties aériennes important pour l'As. Ceci semble s'expliquer par une forte expression du transporteur de silicium LSI2 dont Ma et son équipe (2008) ont montré qu'il possédait la faculté de transporter l'As.

2. Phytotoxicité de l'arsenic

L'As n'est pas un élément essentiel pour les plantes. Une fois absorbé, il entre en compétition avec des métabolites essentiels, ce qui le rend phytotoxique (Bowen 1979). Comme c'est le cas pour l'homme, la toxicité de cet élément pour les plantes dépend de sa nature chimique, les formes inorganiques étant plus toxiques que les formes organiques. Cette toxicité est aussi dépendante du degré d'oxydation : l'As natif (As(0)) est plus toxique que

l'arsénite (As (III)) et l'arséniate (As(V)) est la moins toxique des formes (Liu *et al.*, 2005 ; Duquesnoy *et al.*, 2009).

Chez les plantes, l'excès métallique est généralement perçu comme un facteur de stress qui entraîne une perturbation de leurs réactions physiologiques (Benavides *et al.*, 2005 ; Sharma et Dubey, 2005 ; Clemens, 2006). En effet, la présence de l'As dans le sol et la capacité de certains végétaux à l'accumuler dans ces organes, peut entraîner des effets toxiques :

- Inhibition de la germination (Li *et al.*, 2007) ;
- Diminution de la croissance (Stoeva *et al.*, 2005 ; Rahman *et al.*, 2007) ;
- Modifications de l'architecture du système racinaire (Li *et al.*, 2007) ;
- Altération des fonctions physiologiques (photosynthèse, état hydrique) (Stoeva *et al.*, 2005 ; Mateos-Naranjo *et al.*, 2012) ;
- Modification éventuelle de l'organisation tissulaire et de la perméabilité cellulaire (Shri *et al.*, 2009) ;
- Chlorose et nécrose (Gulz *et al.*, 2005) ;
- Réduction de la surface foliaire par diminution de la taille des cellules (Knauer *et al.*, 1999).
- A forte concentration, l'As inorganique entraîne la précipitation des protéines en interagissant avec les liens sulfures et les sites actifs (Jana, 2009).

2.1. Effet de l'arsenic sur le développement des plantes

La croissance est un processus commun à tous les organismes vivants. Au niveau cellulaire, les composants de la croissance sont la division, l'élongation cellulaire et la production de diverses substances cellulaires. Un déficit de développement et de croissance est une des réponses les plus fréquentes et la première observable lorsque des plantes sont soumises à un stress (Adriano, 2001 ; Sandalio *et al.*, 2001 ; Sobkowiak et Deckert, 2003). Ainsi, la mesure de la croissance est considérée comme un paramètre biométrique souvent utilisé pour déterminer un éventuel effet phytotoxique des ETM (Stoeva *et al.*, 2005).

De nombreuses études visant à évaluer l'inhibition de développement en présence d'As ont été effectuées sur différentes espèces notamment sur le riz, *Oryza sativa* L. (Rahman *et al.*, 2007), le blé, *Triticum aestivum* L. (Li *et al.*, 2007), le haricot, *Phaseolus vulgaris* L. (Stoeva *et al.*, 2005) ou sur le trèfle, *Trifolium pratense* L. (Mascher *et al.*, 2002). Ces études mettent notamment en évidence une réduction de la croissance racinaire et des parties

aériennes, une diminution de la surface des feuilles, des chloroses et nécroses des feuilles. De part leur contact direct avec les contaminants du sol, les racines des plantes sont l'organe où les premiers signes d'altérations de la croissance sont observés (Zhang *et al.*, 2009). Cependant, Cao et son équipe (2009) ont montré que des concentrations en As inférieures ou égales à 100 mg.kg⁻¹ dans les sols peuvent stimuler la croissance et le développement des racines.

Diverses conséquences biologiques dues au contact des plantes avec l'As peuvent également contribuer à l'inhibition de leur croissance, comme une perturbation de l'activité de certaines enzymes intervenant dans des processus physiologiques essentiels au développement (photosynthèse, respiration) (Han *et al.*, 2002; Liu et Zhang, 2007; Liu *et al.*, 2007).

2.2. Toxicité de l'arsenic au niveau physiologique et biochimique

La phytotoxicité de l'As peut entraîner de fortes perturbations dans le métabolisme de la plante et ainsi perturber son activité photosynthétique. En effet, l'appareil photosynthétique apparaît comme étant une des principales cibles des ETM (Prasad, 1999).

2.2.1. Impact de l'arsenic sur les teneurs en chlorophylles

Les chlorophylles, constituées d'un noyau tétrapyrrolique relié à un atome de Mg, sont des pigments photosynthétiques essentiels au processus de la photosynthèse. Elles sont regroupées en amas, dans les membranes des thylakoïdes des chloroplastes des feuilles, au niveau des photosystèmes qui permet la transformation de l'énergie photonique en énergie chimique. Un stress abiotique, comme une pollution du sol par l'As, peut entraîner une inhibition de la voie de biosynthèse des chlorophylles et aboutir à un dysfonctionnement des centres réactionnels du système photosynthétique (Prasad, 1999).

Plusieurs travaux ont mis en évidence un impact d'une contamination en As dans le sol sur la biosynthèse des pigments chlorophylliens chez différentes espèces végétales (Stoeva *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2007 ; Rahman *et al.*, 2007). Ces effets semblent être dépendants de l'âge des feuilles, les feuilles matures étant plus sensibles que les jeunes feuilles (Krupa et Moniak, 1998 ; Rahman *et al.*, 2007). De même, une hausse de la teneur en chlorophylle peut-être observée chez une espèce végétale tolérante alors qu'une baisse sera mesurée chez une population sensible (Prasad, 1999). Jain et Gadre (1997) se sont concentrés sur les cibles de l'As dans la voie de biosynthèse des chlorophylles. Ils ont observé une action inhibitrice de l'As sur l'activité chlorophyllase après quelques heures d'exposition, ce qui semble indiquer

que l'As agit sur la biosynthèse et non sur le catabolisme des chlorophylles. D'autre part, la disponibilité de l'acide δ -aminolévulinique (ALA), le précurseur des tétrapyrroles (Tanaka et Tanaka, 2007), est limitée en présence d'As. Cette molécule est synthétisée par deux voies distinctes chez les plantes, soit à partir du succinyl CoA et de la glycine, soit à partir du glutamate (Eckhardt *et al.*, 2004). Une interaction de l'As avec des groupements thiols pourrait être responsable de l'inhibition des enzymes intervenant dans les voies de synthèse de l'acide δ -aminolévulinique (Jain et Gadre, 2004).

2.2.2. Effet sur le fonctionnement des photosystèmes

L'appareil photosynthétique est situé dans la membrane des thylakoïdes. Il est organisé autour de deux centres photorécepteurs appelés les photosystèmes (PSI et PSII), eux-mêmes constitués d'un centre réactionnel (une paire de molécules de chlorophylles *a* ou P680 pour le PSII et P700 pour le PSI) et d'une antenne collectrice (chlorophylles *a*, *b* et caroténoïdes). Ces photosystèmes, et notamment le photosystème II (PSII), permettent l'absorption des photons déclenchant les réactions photochimiques de la photosynthèse, ils jouent donc un rôle majeur dans l'activité physiologique des plantes.

La fluorescence chlorophyllienne permet d'évaluer la capacité et l'efficacité des photosystèmes à convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (Maxwell et Johnson, 2000). En effet, la lumière absorbée par l'appareil photosynthétique n'est pas totalement transformée en énergie chimique, une partie est perdue sous forme de chaleur et de fluorescence (Figure I.17). Le devenir de l'énergie lumineuse captée est fonction de l'état physiologique de la plante, environ 2 à 3 % de la lumière absorbée par le PSII est réémise sous forme de fluorescence (Maxwell et Jonhson, 2000). Cette émission permet de traduire les pertes d'énergies lors des transferts des électrons excités, des chlorophylles vers les centres réactionnels. La fluorescence chlorophyllienne exprime donc l'énergie lumineuse réfléchi par la plante, plus elle est élevée, plus la plante est stressée (Maxwell et Jonhson, 2000).

Un stress environnemental tel que la présence d'ETM en excès dans le sol peut altérer l'activité photosynthétique des plantes (Murata *et al.*, 2007 ; Lage-Pinto *et al.*, 2008). En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une diminution de l'efficacité des PSII matérialisée par une forte baisse de l'efficacité photochimique maximale (F_v/F_m) suite à des contaminations du sol par le Cd (He *et al.*, 2008 ; Ci *et al.*, 2009), le Cu (Mateos-Naranjo *et al.*, 2008), le Cr (Vernay *et al.*, 2007), l'As (Stoeva et Bineva, 2003 ; Wang *et al.*, 2012) ou encore le Pb (Liu *et al.*, 2010). Pour une espèce végétale donnée, la nature de l'élément, sa concentration et la durée d'exposition sont les principaux facteurs déterminants les effets

engendrés (Chugh et Sawhney, 1999). D'une manière générale, le photosystème II (PSII) semble plus sensible que le photosystème I (PSI) (Dazy, 2008). Au niveau du PSII, l'action des métaux et métalloïdes est principalement située au niveau du Complexe d'Emission de l'Oxygène (OEC) représenté par une manganoprotéine mais aussi au niveau de l'activité du P680 et des quinones (Q_A et Q_B) (Dazy 2008). Concernant le PSI, la ferrédoxine et le P700 semblent être les cibles principales des polluants (Prasad, 1999). Au-delà de l'altération de l'activité des photosystèmes, des effets toxiques des ETM ont été relevés sur le fonctionnement des plastocyanines mais aussi au niveau des plastoquinones et du cytochrome (Prasad, 1999). Par ailleurs, la diminution des performances photosynthétiques peut-être reliée aux teneurs en chlorophylles mesurées dans les feuilles, celles-ci ont un impact direct sur la proportion d'énergie lumineuse absorbée et sur l'efficacité photochimique des photosystèmes (Mateos-Naranjo *et al.*, 2011).

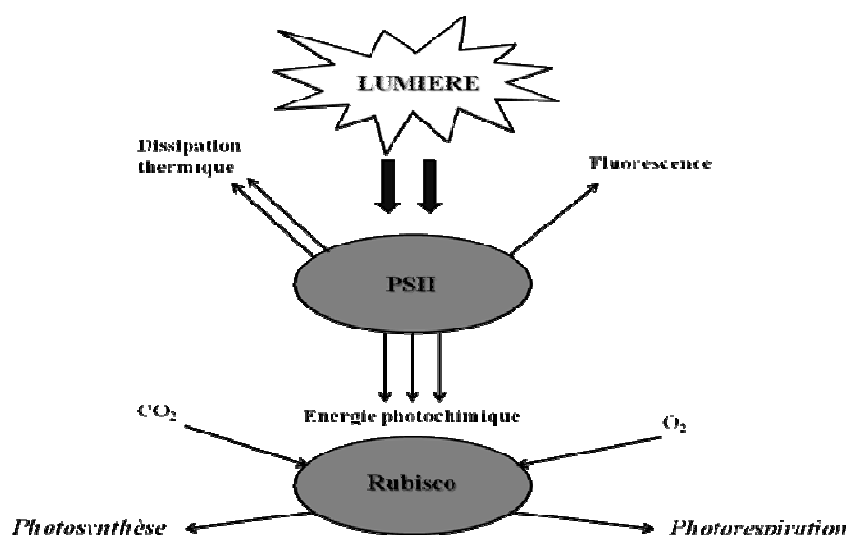


Figure I.17 : Utilisation de l'énergie lumineuse incidente reçue par les PSII.

2.2.3. Impact de l'arsenic sur les échanges gazeux photosynthétiques et sur le cycle de Calvin

Les échanges gazeux photosynthétiques ont pour origine le déroulement simultané d'un ensemble de processus donnant lieu à la production ou à la fixation du dioxyde de carbone et d'oxygène gazeux. Les travaux de Schultz et Joutti (2007) et de Vernay et son équipe (2009) ont mis en évidence un impact important des éléments traces sur les échanges gazeux au niveau des feuilles contrôlant l'activité photosynthétique. Celle-ci est souvent caractérisée par une diminution du taux de photosynthèse nette et de la conductance stomatique (He *et al.*, 2008).

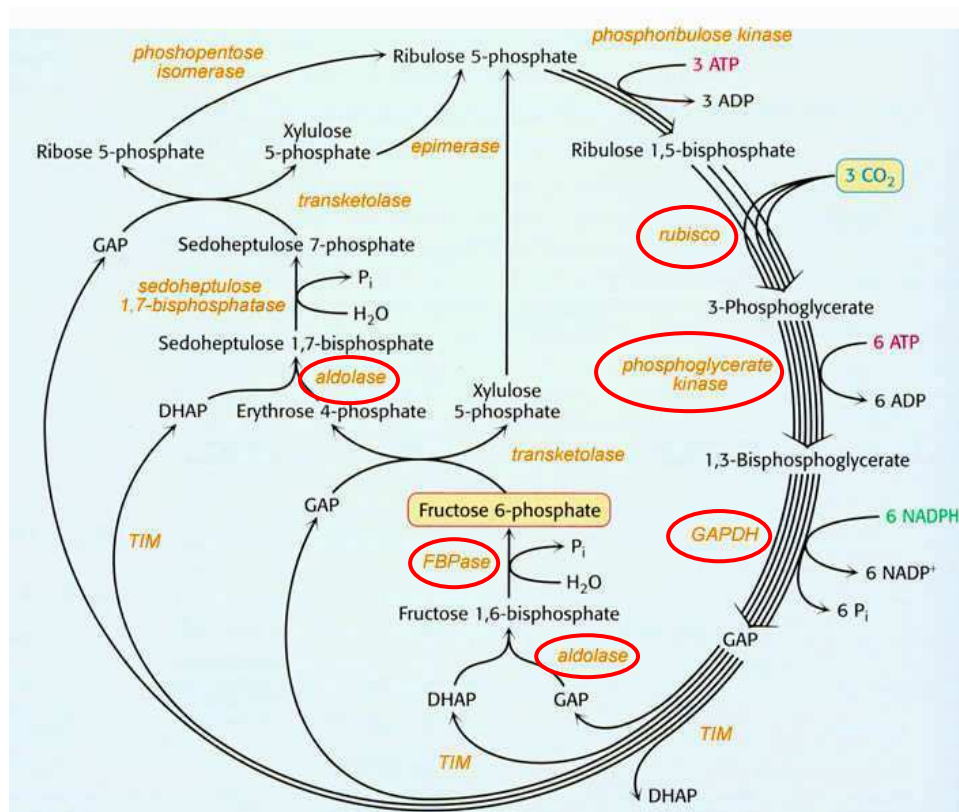


Figure I.18 : Cibles des éléments traces métalliques et métalloïdes dans le cycle de Calvin (Dazy, 2008). Abréviations : Rubisco (Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase) ; GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) ; TIM (Triose Phosphate Isomérase) ; FBPase (Fructose 1,6 biphosphatase) ; GAP (Glyceraldéhyde-3-Phosphate) ; DHAP (Dihydroxyacétone phosphate). Les cibles des ETM sont entourées en rouge.

Chez les plantes, l'exposition à l'As conduit également à une forte inhibition de la photosynthèse, du rendement photosynthétique, et à une limitation du taux d'assimilation de CO_2 (Stoeva et Bineva, 2003). Cette inhibition peut s'expliquer en partie par la diminution des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes généralement constatée (Stoeva et Bineva, 2003 ; Stoeva *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2007 ; Rahman *et al.*, 2007). Cependant, l'altération des échanges gazeux au niveau des feuilles peut-être causée par la fermeture des stomates provoquée par une perturbation de l'état hydrique des plantes suite à un excès d'As (Schurr *et al.*, 2006). La diminution de la conductance stomatique entraîne une limitation du flux de CO_2 entrant, phénomène considéré comme la cause principale de la forte réduction de la fixation du CO_2 (Flexas et Medrano, 2002). L'As peut également inhiber certaines enzymes intervenant dans le cycle de Calvin et notamment la Rubulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui joue un rôle clé dans l'assimilation du CO_2 (Stoeva et Bineva, 2003, Dusquenoy *et al.*, 2009). Ainsi, les trois étapes du cycle de Calvin

(carboxylation, réduction, régénération) sont affectées par les éléments métalliques et métalloïdes, la carboxylation demeurant la plus sensible (Figure I.18 ; Prasad, 1999). L'inactivation des activités enzymatiques et plus particulièrement celle de la Rubisco par le Cd, le Cu, le Pb, l'As ou le Zn, serait liée à une interaction entre ces métaux et les groupements sulfhydryl de cette enzyme (Prasad, 1999).

L'As peut donc provoquer des altérations à différents niveaux dans la plante entraînant une inhibition de l'activité photosynthétique et plus précisément sur :

- La teneur en chlorophylles des feuilles ;
- Le fonctionnement des photosystèmes ;
- Les échanges gazeux au niveau des feuilles ;
- Des désordres de l'ultrastructure des chloroplastes, riches en protéines et pigments, et support de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.

3. Tolérance de l'arsenic chez les plantes

Les mécanismes de tolérances des plantes reposent en partie sur l'efficacité du métabolisme antioxydant. En effet, un stress environnemental, comme la pollution du sol par l'As, entraîne une succession de réaction au niveau biochimique et moléculaire chez les plantes (Panda *et al.*, 2010) :

- Perturbation et mise en place d'un stress oxydant (production d'espèces réactives oxygénées) ;
- Instauration de mécanismes de défenses (métabolisme antioxydant, synthèse de chélateurs organiques, ...) ;
- Substitution de cofacteurs de molécules organiques, telle que la substitution du phosphore par l'As au niveau de l'ADN.

De nombreux mécanismes sont mis en place pour se défendre et tolérer un polluant, ceux-ci dépendent de l'espèce végétale étudiée et de la nature du polluant (Clemens, 2006).

3.1. Le stress oxydatif

Des plantes soumises à un stress environnemental mettent en place une réponse appelée stress oxydatif. Il se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance

des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS) et les systèmes de défense antioxydants (Apel et Hirt, 2004), déséquilibre consécutif à une surproduction de ces composés radicalaires.

Tableau I.7 : Principaux radicaux libres (ERO) produits lors d'un stress oxydatif chez les plantes (*R : substrat organique).

$O_2^{\cdot -}$	radical superoxyde
HO_2^{\cdot}	radical perhydroxyde
$\cdot OH$	radical hydroxyle
RO_2^{\cdot}	radical peroxyde
RO^{\cdot}	radical alkoxyle
H_2O_2, \dots	Formes non radicalaires

Les ERO (Tableau I.7) sont des molécules qui diminuent et empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques. Elles sont produites principalement dans les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes. Par ailleurs, les chaînes de transfert d'électrons au niveau de l'appareil photosynthétique sont également capables de produire une grande quantité d'ERO *via* les cytochromes (Parent *et al.*, 2008). Même si les ERO sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress. Si la contribution de la mitochondrie à la production d'ERO lors de la réponse au stress est encore mal définie (Heyno *et al.*, 2008), dans la plupart des situations où les conditions environnementales sont modifiées, une forte augmentation des ERO est observée au niveau des chloroplastes et des péroxysomes (Dal Corso *et al.*, 2008) entraînant un stress oxydatif. L'As génère une forte production d'ERO (Muschitz, 2009). Cette production pourrait être une conséquence de la réduction de l'arséniate en arsénite (Mylona *et al.*, 1998).

Lors du stress oxydatif, une partie des radicaux échappe au système de contrôle et attaque des cibles cellulaires entraînant l'apparition de dégâts souvent irréversibles. En effet, les ERO sont de puissants agents oxydants capables d'altérer toute une série de cibles biologiques importantes, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules (Devi et Prasad, 2004) (Figure I.19) :

- Inhibition de l'activité enzymatique ;
- Perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration) ;
- Oxydation de protéines ;
- Altération des membranes cellulaires *via* l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique ;
- Apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire.

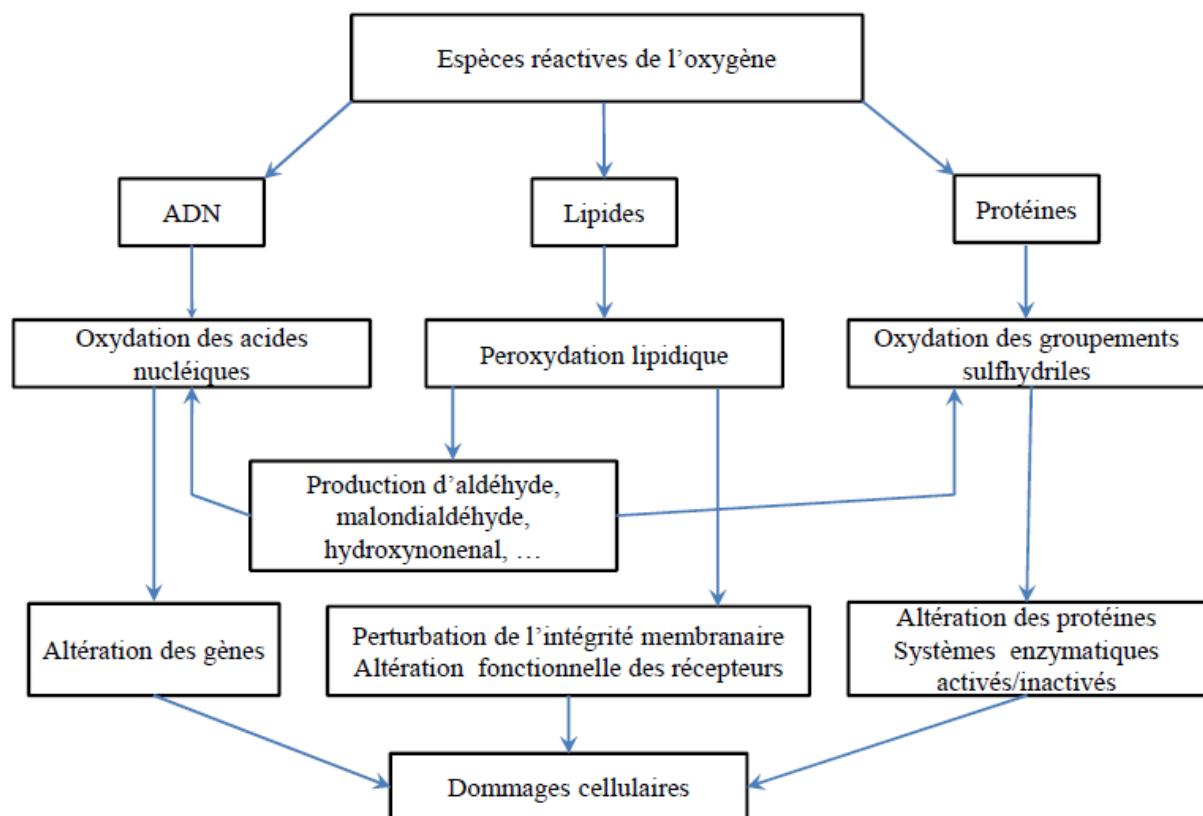


Figure I.19 : Principaux dommages cellulaires induits par les espèces réactives de l'oxygène et provoqués sur les lipides, les protéines et l'ADN (d'après Devi et Prasad, 2004).

Pour toutes ces raisons, les ERO sont généralement considérées comme des molécules toxiques. Cependant, il est aujourd'hui reconnu que leur synthèse joue un rôle essentiel dans la

vie et la mort de la cellule végétale. Elles peuvent agir comme des molécules de signalisation cellulaire pour mettre en place des mécanismes de défense vis-à-vis d'un stress, qu'il soit d'origine biotique ou abiotique (Dat *et al.*, 2000). En effet, de nombreux travaux ont montré que les ERO peuvent intervenir dans les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défense tel que ceux codant pour les protéines de choc thermique (HSP = Heat Shock Proteins) ou les enzymes antioxydantes (Apel et Hirt, 2004 ; Mittler *et al.*, 2004). Elles peuvent aussi intervenir dans la fortification des parois cellulaires lors de l'attaque d'un pathogène (la lignification), des précurseurs phénoliques sont associés entre eux par des réactions dépendantes de l' H_2O_2 pour former les molécules de lignine (Abreu *et al.*, 2001).

3.2. Les systèmes antioxydants de protection

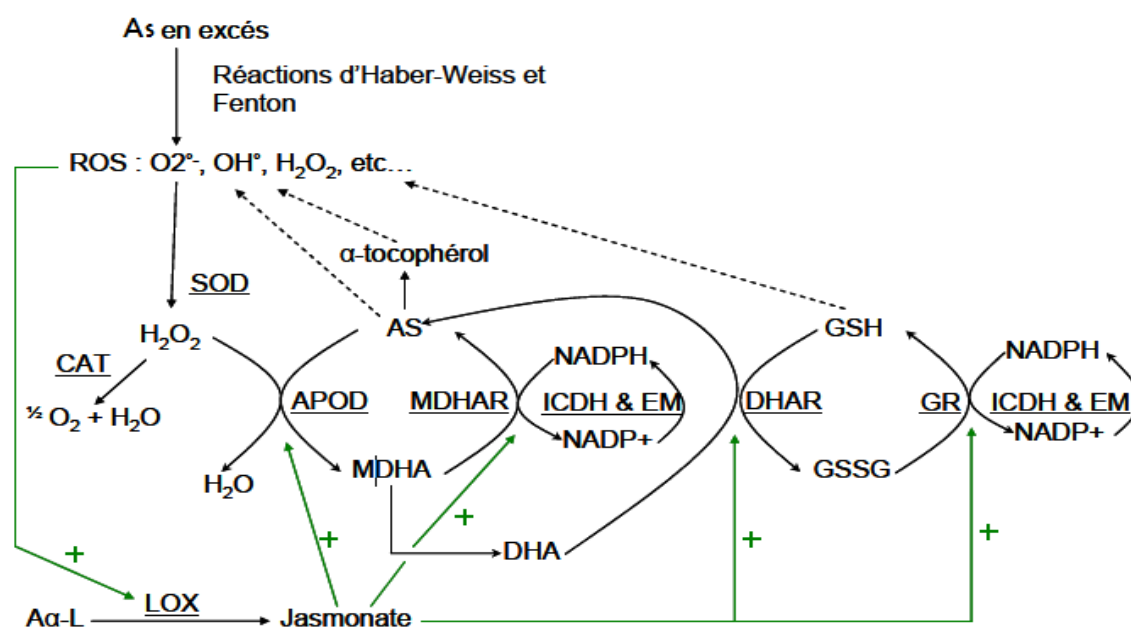


Figure I.20 : Formation et détoxification des radicaux libres lors d'un stress As. ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; LOX : lipoxygénase ; Aα-L : acide α-linolénique ; APOD : ascorbate peroxydase ; AS : ascorbate ; MDHA : monodéhydroascorbate ; MDHAR : MDHA réductase ; DHA : déhydroascorbate ; ICDH : isocitrate déhydrogénase ; DHAR : DHA réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GR : glutathion réductase ; Les noms soulignés sont les noms des enzymes. Les flèches pointillées sont les actions directes de AS, GSH et α-tocophérol sur les ROS et les flèches vertes sont les enzymes dont l'activité est stimulée par les ERO dans le cas des LOX et par le jasmonate dans le cas des autres (Bes, 2008).

Pour réguler les teneurs en ERO, la plante répond par la mise en place de mécanismes de prévention ou/et de détoxification. Les mécanismes de prévention servent à dissiper l'énergie absorbée en excès sous forme non dangereuse pour la plante (chaleur). La détoxification permet d'éliminer les ERO mais aussi de contenir les dégâts provoqués. Celle-ci utilise la capacité des enzymes anti-oxydantes (SOD, peroxydase, catalase, ...) à réduire les espèces oxygénées formées lors du stress oxydatif grâce au pouvoir réducteur des antioxydants (ascorbate, glutathion) (Figure I.20). En effet, lors d'une production physiologique de radicaux libres suite à un stress abiotique, la plante dispose des systèmes de protection qui lui permettent de lutter contre ces espèces radicalaires. Ces systèmes de défenses sont constitués d'un dispositif endogène de nature enzymatique.

3.3. Les cibles des ERO

En cas de stress oxydatif une partie des radicaux échappent au système de contrôle et vont donc pouvoir attaquer des cibles cellulaires. Les radicaux libres provoquent la peroxydation des lipides membranaires, altérant la perméabilité des membranes. Ils entraînent également une rigidité de la membrane augmentant sa perméabilité. De plus, ils provoquent la dénaturation et l'inactivation des protéines (oxydation des acides aminés, désamination en dérivés carbonylés, fragmentation des chaînes polypeptidiques) (Apel et Hirt, 2004). Certaines protéines peuvent au contraire être activées après modifications, comme pour certains facteurs de transcription. Au niveau de l'ADN, de nombreuses lésions sont induites par les ERO. Les bases de l'ADN sont en effet très sensibles aux ERO, qui induisent la formation de nombreux dérivés, par addition, oxydation ou fragmentation (Gill et Tuteja, 2010). Les lésions dues au stress oxydatif peuvent être évaluées tant au niveau des protéines par le dosage des groupements thiols (SH : marqueur d'une non oxydation) ou des groupements carbonyles (C=O, marqueur d'une oxydation), qu'au niveau des lipides par le dosage des produits de dégradation des lipides oxydés (TBARS, Substances Réactive à l'Acide Thiobarbiturique) suite à la peroxydation des lipides membranaires, qu'au niveau de l'ADN par le dosage des bases oxydées ou des cassures de brins (Apel et Hirt, 2004).

L'un des principaux mécanismes étudié pour évaluer les effets du stress métallique sur les plantes est l'étude de la peroxydation lipidique et le dosage des produits de dégradation des acides gras membranaires (TBARS). La peroxydation lipidique est un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires, conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables (Khan *et al.*, 2009). Elle peut être initiée de manière chimique, c'est-à-dire, à l'aide

d'ions de métaux de transition qui engendrent les radicaux HO, mais aussi de manière enzymatique ou thermique. Les produits de la peroxydation sont extrêmement nombreux et certains d'entre eux n'ont pas encore été identifiés, les plus connus sont le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4HNE) (Rémita, 2001).

Différentes expériences ont permis de constater que l'As entraîne la peroxydation des lipides membranaires chez les plantes (Srivastava *et al.*, 2005 ; Shri *et al.*, 2009), entraînant une déstructuration des membranes modifiant leur intégrité, leur fluidité et par conséquent leur perméabilité.

Chapitre IV : La phytoremédiation : un procédé biologique de dépollution des sols

Le traitement des sols regroupe un ensemble de techniques, dont la fiabilité dépend de la nature et de l'importance de la pollution mais aussi de la performance du procédé utilisé et de son coût. L'importance des enjeux environnementaux (pollution des nappes et risques sanitaires) et économiques a permis le développement de différentes technologies pour la réhabilitation de sites pollués. Dans ce contexte, l'usage futur du site conditionne fortement le choix de traitement.

Afin de pallier aux principales limitations des méthodes actuellement disponibles dans les stratégies de dépollution (traitement *ex-situ* par dégradation biologique des polluants organiques, désorption thermique, incinération ou lavage du sol après extraction), les recherches s'orientent depuis quelques années vers l'utilisation de plantes supérieures. En effet, il a été mis en évidence que la présence d'un couvert végétal induit ou stimule la biodégradation de contaminants organiques (Reilley *et al.*, 1996). De même, certaines plantes, dites métallobytes, sont capables de se développer et de se maintenir spontanément sur des sites fortement contaminés par divers ETM et certains de ces végétaux, qualifiés d'hyperaccumulateurs, ont la capacité de stocker massivement les ETM dans leurs parties aériennes (Brooks, 1998). Les études concernant l'écophysiologie et le métabolisme des plantes supérieures en milieu contaminé, ont progressivement permis d'insérer le concept de phytoremédiation à côté de celui de bioremédiation des sites pollués. Aujourd'hui, le terme de phytoremédiation est largement accepté et regroupe un ensemble de méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un objectif de réhabilitation de sites pollués.

1. Généralités

Selon la définition énoncée par l'ADEME en 2006, la phytoremédiation est « *un procédé basé sur l'utilisation de la capacité de certains végétaux (herbacées, plantes, arbustes, arbres) à se développer en milieux contaminés. En effet, ces végétaux peuvent bloquer, extraire, accumuler, transformer ou détruire un polluant. Ce procédé peut s'appliquer au traitement des sols, des boues, des sédiments, des effluents liquides voire gazeux. Les polluants traités sont les métaux, les solvants, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les explosifs, les produits phytosanitaires, ...* ».

Cette technique utilise les plantes pour réhabiliter un écosystème pollué et/ou réduire les risques dans les relations sources - exposition - récepteurs. Elle regroupe un ensemble de techniques de biotechnologies ayant obtenu des résultats encourageants pour des problématiques diverses et permettant de traiter de grandes surfaces de sols ou des volumes d'effluents liquides et d'air à de faibles coûts.

2. Les différentes techniques de phytoremédiation

Les études réalisées à ce jour permettent d'envisager cinq types de stratégies de phytoremédiation (Figure I.21) particulièrement prometteuses.

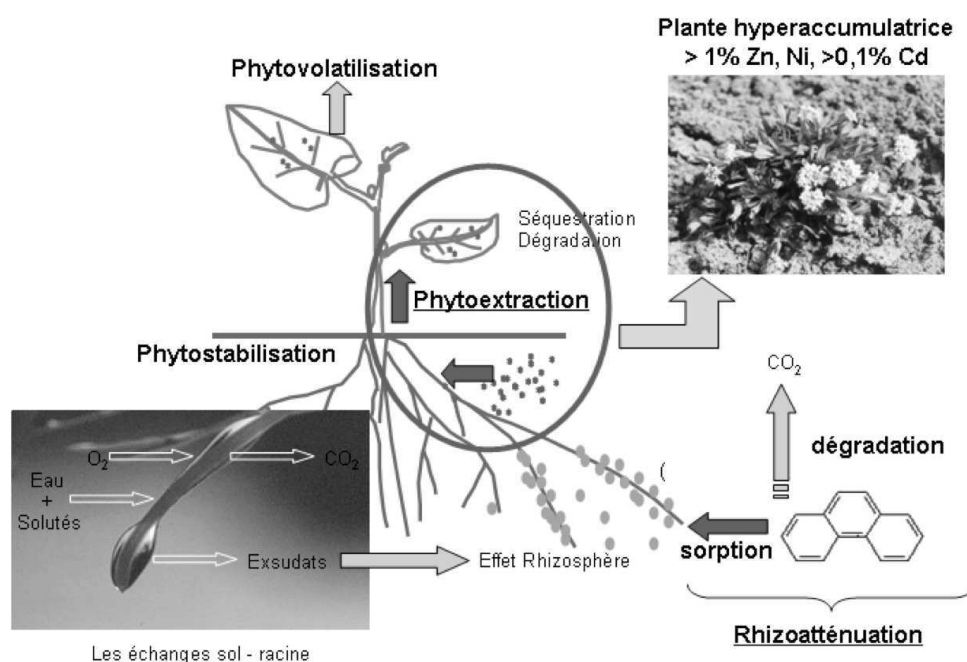


Figure I.21 : Les différents procédés de phytoremédiation et le rôle des plantes (Morel, 2010).

- *Phytostimulation ou rhizoatténuation* : au niveau de la rhizosphère l'association entre les plantes et les microorganismes du sol permettent la dégradation des contaminants organiques. Cette méthode est notamment utilisée depuis plusieurs années par l'armée américaine dans le cadre de la dépollution de sites contaminés par des explosifs (TNT). Des travaux de recherches ont montré son intérêt dans la dégradation de l'atrazine (Cuadrado *et al.*, 2010).

- *Phytovolatilisation* : se réfère à l'absorption et la transpiration des contaminants, composés essentiellement organiques, par les plantes. Les composés sont volatilisés sous une forme non toxique. Une étude a mis en évidence la capacité des peupliers à volatiliser 90 % du TriChloroEthylène (TCE) contenu dans le sol (EPA, 1998). Des travaux plus récents menés par Mohapatra *et al.* (2008) ont mis en évidence une élimination de l'As contenu dans des boues par volatilisation en utilisant des microorganismes anaérobies.

- *Rhizofiltration* : cette méthode s'applique à la restauration des eaux de surface et souterraines polluées. Le principe est d'utiliser les capacités élevées du système racinaire de certaines espèces végétales pour extraire par absorption ou adsorption les polluants d'un milieu liquide. Cette méthode a notamment été testée en Ukraine dans le cadre de la dépollution du site de Tchernobyl (Schnoor, 1997) et par Vaillant *et al.* (2004) pour l'épuration des eaux usées urbaines.

- *Phytoextraction* : elle est basée sur l'utilisation de végétaux hyperaccumulateurs, qui absorbent les ETM du sol de façon sélective et les accumulent dans les organes aériens faciles à récolter (McGrath, 1998). Ces espèces végétales doivent posséder une biomasse aérienne importante, être compétitives et tolérantes à la contamination et à des conditions agronomiques défavorables (Pilon-Smits, 2005). Cette technologie efficace pour une grande variété d'ETM (Pb, Cd, Ni, Zn, ...), est aujourd'hui proposée par de nombreuses sociétés américaines avec un marché potentiel pour l'Europe et les Etats Unis de 1,2 à 1,4 Milliards \$ pour le traitement des sites pollués par des ETM (Lewandowski *et al.*, 2006).

Cette technique est complétée par le concept de phytoextraction induite. Elle se base sur l'utilisation de plantes à fortes biomasse et à croissance rapide. L'accumulation des éléments traces est stimulée par l'ajout d'un agent chélateur organique naturel (acides aminés, acides organiques, ...) ou de synthèse (Acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA), Ethylène Glycol Tétracétique (EGTA), ...) afin d'augmenter la biodisponibilité de l'élément

ciblé (Evangelou *et al.*, 2007 ; Komárek *et al.*, 2010). De nouvelles approches s'orientent vers l'utilisation de plantes génétiquement modifiées, telles que *Nicotiana tabaccum*, *Brassica oleracea*, *Populus tremula* × *P. alba*, ..., avec une stimulation de plusieurs fonctions tels que l'activité des transporteurs membranaires, la production des enzymes du métabolisme du soufre et la synthèse de chélatants intracellulaires tels que les métallothionéines ou les phytochélatines (Sappin-Didier *et al.*, 2005 ; Kotrba *et al.*, 2009).

L'un des inconvénients de cette technique est la création d'une nouvelle source d'exposition avec un risque d'entrée des contaminants dans la chaîne trophique et leur potentiel retour au sol avec la chute des feuilles et la formation de la litière (Stoltz & Greger 2002). Ainsi, Blaylock *et al.* (1997) ont montré que l'utilisation de *Brassica juncea* dans un procédé de phytoextraction assistée entraîne la production de 6 t.ha⁻¹ de déchet biologique qui peut contenir de 1 à 1,5 g de Pb par kg de matière sèche. Une des premières étapes de traitement de ces déchets est la réduction de volume par compostage ou par compaction avec obligatoirement la prévision d'un système de récupération des lixiviats (Raskin *et al.* 1997). La biomasse est ensuite principalement traitée par voie thermochimique (Ghosh et Singh 2005). Le produit final peut être stocké dans un centre d'enfouissement ou subir une extraction liquide des ETM dans les cendres (Sas-Nowosielska *et al.*, 2004).

- *Phytostabilisation* : elle permet de réduire de manière chimique ou biologique la fraction disponible des polluants dans le sol rhizosphérique, en les stockant dans le système racinaire ou en favorisant son insolubilisation dans la rhizosphère. L'implantation de plantes vivaces sur le sol permet de limiter la dispersion et le transfert des polluants vers d'autres milieux (Alvarenga *et al.*, 2008 ; Kumpiene *et al.*, 2009). En effet, l'apport d'un couvert végétal sur un sol pollué limite les risques d'érosions et de lessivage du sol. Dans ce cas, il n'est pas recherché une extraction des polluants mais leur maintien dans l'environnement des racines. Des végétaux avec un système racinaire important sont privilégiés pour augmenter les surfaces de contact sol-plante. Cette approche vise ainsi à limiter les risques de transfert de la pollution en dehors du sol contaminé et permet en même temps une meilleure intégration paysagère pour des sites présentant d'importants volumes impossibles à stocker en décharge de classe I. Les plantes candidates pour un procédé de phytostabilisation doivent avoir plusieurs propriétés, notamment une capacité de colonisation du site facile, une croissance rapide, être tolérantes aux contaminants, une faible translocation du métal vers les parties supérieures, un cycle de vie long, un fort taux de reproduction et des avantages commerciaux/économiques pour rentabiliser le site contaminé (Mench *et al.*, 2005).

Cette technique peut être améliorée par un apport d'amendements aux sols capables de réduire la mobilité et la disponibilité des ETM ou de fertiliser le sol. Le but de l'ajout des amendements est d'augmenter la sorption des contaminants sur les phases porteuses solides du sol ou de favoriser des réactions physico-chimiques (e.g. augmentation du pH) ou biologiques qui font diminuer le pool labile en contaminants notamment dans la solution du sol (Gupta et Sinha, 2006). Plusieurs mécanismes réactionnels sont possibles, la sorption - adsorption, les réactions acide - base, la précipitation, l'échange d'ions, la complexation ou l'oxydoréduction (Williford *et al.* 2001, Mench *et al.* 2003).

De nombreux matériaux sont connus pour ces propriétés, tels que la béringite (Mench *et al.*, 2003 ; 2006), les cendres volantes (Gupta et Sinha, 2006 ; Pourrut *et al.*, 2011), la montmorillonite (Huang *et al.*, 2010), la zéolite (Shi *et al.*, 2009), la grenaille de fer (Mench *et al.*, 2003 ; 2006 ; Kumpiene *et al.*, 2011), la matière organique (Mench *et al.*, 2003 ; Shi *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2011), les produits phosphatés ou carbonatés (McGowen *et al.*, 2001 ; Hettiarachchi et Pierzynski, 2002), les oxydes et hydroxydes d'aluminium, de fer et de manganèse (Hettiarachchi et Pierzynski, 2002).

Le recours aux végétaux supérieurs dans les stratégies de dépollution est donc considéré aujourd'hui avec un intérêt croissant. Sur le continent Nord-Américain, les techniques de phytoremédiation sont particulièrement utilisées, une vingtaine de brevets a été déposée au cours de ces 7 dernières années. Certains d'entre eux protègent une méthodologie spécifique et bénéficient d'une couverture internationale (Raskin *et al.*, 1994 ; Chaney *et al.*, 1998), alors que les autres ont trait à des mises au point techniques ou à l'utilisation d'espèces végétales.

3. Les espèces végétales métallobytes

La végétation présente sur les divers types d'habitats métallifères présentent une spécialisation écologique, une fréquence de rareté et un risque d'extinction élevés (Whiting *et al.*, 2004). Les conditions écologiques extrêmes rencontrées sur les sites métallifères entraînent la formation de phytocénoses originales (Ernst, 1974). Celles-ci sont composées, d'une part, d'un nombre important d'espèces endémiques apparues probablement par le jeu de l'isolement écologique et géographique (Rajakaruna, 2004). Pour les sites métallifères anthropogènes, la végétation métallicole est, d'autre part, caractérisée par des espèces locales

provenant des habitats non métallifères voisins qui ont colonisé rapidement ces milieux contaminés en acquérant des capacités de résistance aux ETM présents (Schat & Ten Bookum 1992).

Les végétations dites métallicoles présentent des caractéristiques communes (Faucon, 2009) :

- Une rareté et un faible recouvrement des phanérophytes ;
- Une surreprésentation des espèces à stratégie stress-tolérante ;
- Une sous-représentation des arbres ;
- Un recouvrement total souvent < 100 % ;
- Une faible productivité.

Les plantes métallobytes sont des plantes qui se développent préférentiellement ou exclusivement sur un sol riche en un métal donné (Remon, 2006). Selon la classification de Lambinon & Auquier (1963), ont été distingués :

- Les métallobytes absolues pour les taxons endémiques des sols métallifères ;
- Les pseudométallobytes pour les espèces présentes sur sols métallifères et non métallifères.

Dans ce présent travail nous utiliserons le terme « métallobyte » pour désigner toutes les plantes qui se développent spontanément sur un sol métallifère.

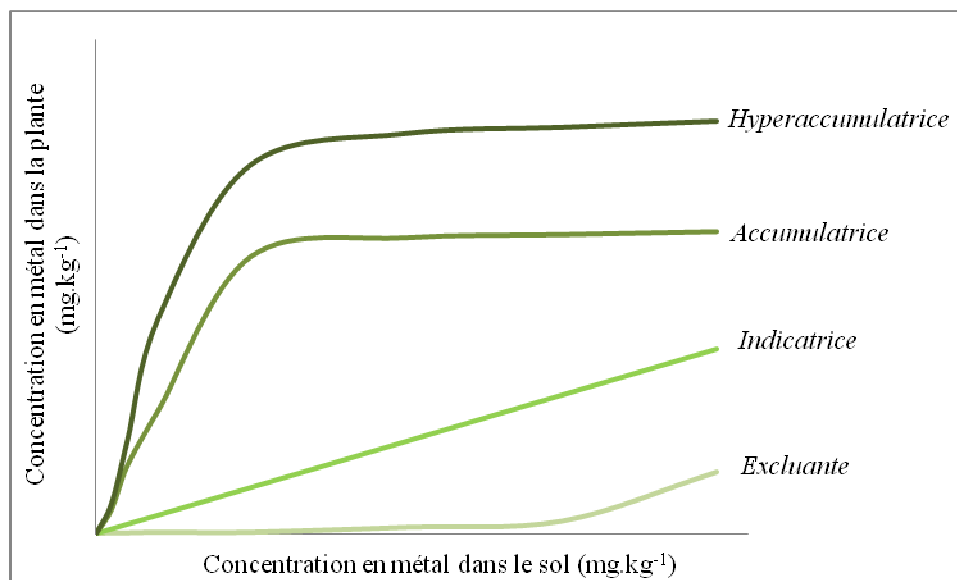


Figure I.22 : Catégories des plantes présentes sur des sols contaminés par des ETM (Prasad et Hagemeyer, 1999).

Pour s'implanter, se développer et se reproduire sur des sols riches en polluants métalliques et métalloïdes, les espèces métalrophytes ont développé des stratégies distinctes pour tolérer, accumuler et transporter les éléments traces en excès dans le sol (Remon, 2006). Selon les paramètres physico-chimiques des sols, la nature des éléments métalliques, leurs teneurs et leurs spéciations, les espèces végétales, les variétés et les processus impliqués dans la rhizosphère, les mécanismes mis en jeu par les plantes sont différents (Figure I.22).

En fonction du facteur de transfert sol-plante des ETM, les plantes peuvent être classées en quatre groupes (Remon, 2006).

- *Les plantes excluantes* mettent en place des mécanismes d'exclusion des ETM mettant en jeu deux stratégies distinctes. D'une part, l'exclusion est caractérisée par le phénomène d'évitement défini comme la capacité de certains organismes à empêcher l'absorption des métaux (Baker & Walker, 1990). Il est observé notamment chez les bactéries, les champignons et les algues, il semble plus rare chez les végétaux supérieurs (Baker & Walker, 1990). D'autre part, les végétaux tolérants aux ETM dits « exclueurs » absorbent les métaux et métalloïdes mais ils sont capables de réduire leur translocation vers la partie aérienne en les séquestrant dans les tissus racinaires (Pauwels, 2006). Certaines métalrophytes présentent un mécanisme de détoxification en larguant l'excès de métaux dans leurs feuilles mortes (Dahmani-Muller *et al.*, 2000). A partir d'une concentration critique dans le sol, les ETM sont massivement transportés vers les feuilles et provoquent des dégâts liés à leurs toxicités. Chez des écotypes de *Holcus lanatus*, Meharg et Macnair (1992 et 1994) ont expliqué la capacité excluante vis-à-vis de l'As par une faible affinité des transporteurs membranaires des phosphates pour l'As.

- *Les plantes accumulatrices* sont caractérisées par une forte biomasse et un enracinement important permettant d'augmenter leur surface de contact avec le sol et leur capacité de stockage des éléments traces. Les métaux et métalloïdes absorbés sont concentrés préférentiellement dans les parties aériennes de la plante (Faucon, 2009). L'accumulation s'accompagne alors d'une détoxification des ETM par de nombreux processus moléculaires qui s'orientent souvent vers la complexation des polluants avec des molécules organiques pour faciliter leur transfert ou leur stockage. Différents mécanismes sont impliqués dans l'accumulation des métaux et métalloïdes chez les plantes, tels que la capacité à mobiliser les ETM du sol pour les absorber dans le système racinaire, la séquestration d'une partie dans les

vacuoles des cellules racinaires, leur transfert vers les parties aériennes *via* le xylème pour permettre leur stockage dans les vacuoles des cellules foliaires (Clemens *et al.*, 2002 ; Verbruggen *et al.*, 2009). L'utilisation de ce type de plantes en phytoextraction présente l'avantage de produire une plus grande quantité de biomasse permettant une meilleure absorption des éléments traces et en cas de valorisation, une plus forte production. Une étude a été menée sur différents cultivars de *Salix* pour la phytoextraction du Cd, Cu, Hg, Pb et Zn sur un site contaminé et a montré une capacité d'absorption spécifique au métal et à la variété de *Salix* utilisée, mais aussi une production relativement importante de biomasse aérienne (Mleczek *et al.*, 2010).

- Les *plantes hyperaccumulatrices* possèdent deux caractéristiques essentielles. D'une part, un facteur de translocation (FT), rapport de la concentration en ETM dans les feuilles à la concentration en ETM dans les racines, qui est supérieur à 1 et d'autre part, elles concentrent les polluants métalliques à des concentrations au moins 10 fois plus importantes que les plantes accumulatrices et souvent supérieures à 0,1 % de matière sèche exceptées pour le Cd et Hg (Zhao, 2009). La plupart des plantes hyperaccumulatrices n'accumulent pas les ETM de manière similaire (Tableau I.8). Ainsi, *A. halleri* est une espèce hyperaccumulatrice de Cd et de Zn dans les feuilles mais accumulent principalement le Cu et le Pb dans les racines (Dahmani-Muller *et al.*, 2001). Le terme d'espèce hyperaccumulatrice a été également défini comme étant une plante capable d'accumuler dans ses feuilles des teneurs en ETM supérieures à (Baker *et al.* 2000) :

- 10 µg de Hg /g de MS (matière sèche),
- 100 µg de Cd /g de MS,
- 1000 µg de As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se /g de MS,
- 10 000 µg de Mn, Zn /g de MS.

À ce jour, environ 400 espèces végétales ont été identifiées comme hyperaccumulatrices d'un métal ou métalloïde donné, représentant à peine 0,2 % de toutes les angiospermes (Brooks, 1998 ; Baker *et al.*, 2000). De fait, peu d'espèces végétales sont reconnues aujourd'hui comme des hyperaccumulatrices d'As (Gonzaga *et al.*, 2006). La majorité des espèces connues sont des fougères de la famille des Pteridaceae et en premier lieu *Pteris Vittata* L. (Ma *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2007), suivi de *Pityrogramma calomelanos* L. (Francesconi *et al.*, 2002) et de nombreuses autres espèces du genre *Pteris*, tel que *P. cretica* L. (Zhao *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2007), *P. longifolia* L., *P. umbrosa* L., *P.*

argyrea L. (Zhao *et al.*, 2002), *P. quadriaurita* L., *P. ryiunkensis* L. et, *P. biaurit* (Srivastava *et al.*, 2005).

La plupart des plantes hyperaccumulatrices sont caractérisées par un faible enracinement et une croissance lente, ce qui les rend moins efficaces pour une utilisation à grande échelle par rapport aux espèces accumulatrices à forte biomasse (Prasad et Hagemeyer, 1999).

Tableau I.8 : Nombre d'espèces hyperaccumulatrices connues pour différents métaux et métalloïdes et familles les plus représentées (Baker *et al.*, 2000 ; Dubourguier *et al.*, 2001 ; Krämer, 2010 ; Rascio et Navari-Izzo, 2011).

Eléments	Nombres d'espèces	Nombre de familles	Famille les plus représentées
As	2	1	<i>Pteridaceae</i>
Cd	2	1	<i>Brassicaceae</i>
Co	28	11	<i>Lamiaceae, Scophulariaceae</i>
Cu	37	15	<i>Cyperaceae, Poaceae, Lamiaceae, Scophulariaceae</i>
Mn	9	5	<i>Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae</i>
Ni	317	37	<i>Brassicaceae, Cunoniaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Violaceae</i>
Pb	14	7	<i>Asteraceae, Brassicaceae</i>
Se	20	7	<i>Fabaceae</i>
Tl	1	1	<i>Brassicaceae</i>
Zn	13	5	<i>Brassicaceae, Violaceae</i>

- *Les plantes indicatrices* présentent une capacité de prélèvement des ETM proportionnelle à la fraction totale en ETM dans les sols jusqu'à des teneurs toxiques. Dans ce cas, l'absorption est régulée ou se fait de manière passive. Les plantes sont dites indicatrices car les concentrations mesurées dans la plante reflètent celles observées dans le sol.

A l'heure actuelle, le principal obstacle au développement des procédés de phytoremédiation réside dans le nombre réduit d'espèces potentiellement utilisables à l'échelle industrielle. En effet, la sélection d'espèces métallophytes est dépendante du type de polluant mais aussi des conditions de culture (climatiques et édaphiques) et des caractéristiques de

l'espèce sélectionnée (vivaces ou pérenne, non invasive...). Tout ces paramètres sont difficiles à contrôler et représentent une limitation supplémentaire du procédé. Par conséquent, il est nécessaire de poursuivre les recherches afin de sélectionner de nouvelles plantes tolérantes et/ou accumulatrices et de mieux comprendre leur comportement sur site pollué.

Deuxième partie : Matériels et méthodes

Chapitre I : Présentation et localisation du site d'étude

1. Localisation géographique

La friche industrielle de la « Vieille Usine » d'Auzon se situe sur la commune d'Auzon dans le département de la Haute-Loire en région Auvergne (carte IGN 1/25 000 : 2633 O St Germain – Lembron, Figure II.1). La commune est située dans le parc Livradois-Forez, le plus grand parc naturel régional français. Le canton a une superficie de 155 km², son altitude s'échelonnant entre 400 et 1 100 mètres d'altitude (l'altitude du site est de 456 m), il est limitrophe au département du Puy-de-Dôme. Le site est situé à 110 km d'Aurillac (15), 60 km de Clermont-Ferrand (63) et 10 km de Brioude (43). Sa géolocalisation est 45°23'11.67" N, 3°21'32.42" E.

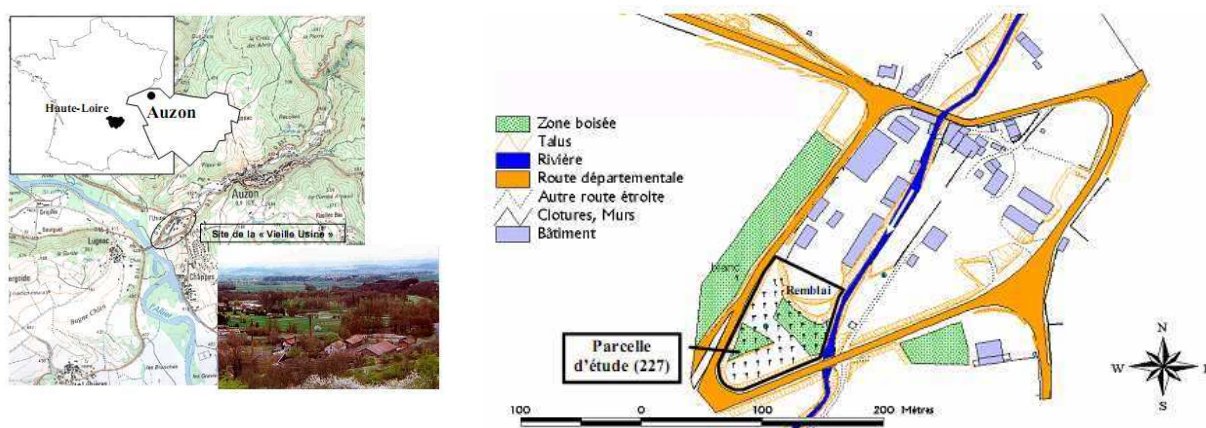


Figure II.1 : Carte IGN 2633 O St Germain-Lembron (Cancès, 2004) et carte de l'ancienne usine d'Auzon (Eisenlohr, 2000).

Le site de "la Vieille Usine" est fragmenté en plusieurs parcelles. L'ensemble des terrains appartient à trois propriétaires : la Commune d'Auzon, le Conseil Général de Haute Loire et l'Etat. La parcelle 227 (4 400 m²) située au sud-ouest du site, est constituée d'un sol naturel partiellement boisé, elle fait l'objet de la présente étude (sol Auzon Pollué ou AP, Figure II.2).

Dans le cadre de nos expérimentations en conditions contrôlées et *in-situ*, un site témoin (sol Auzon Témoin ou AT, Figure II.2) a été sélectionné pour évaluer l'effet de la pollution sur le développement et l'activité physiologique et biochimique de la végétation. Ce

site référence est situé au bord de l'Allier, à proximité de la "Vieille Usine d'Auzon" (45°23'13.67"N, 3°21'24.32"E), sur des terres agricoles non exploitées au cours de ces dix dernières années. Le sol est formé des alluvions de l'Allier, cependant, l'impact de l'activité anthropique a entraîné la formation d'un anthroposol. La végétation est de type prairial.



Figure II.2 : Localisation de la parcelle 227, zone d'étude située au sud-ouest du site pollué, et de la parcelle témoin installée sur la plaine alluviale de l'Allier.

2. Historique du site

L'activité industrielle de l'usine, exploitée par la "Compagnie Minière et Métallurgique d'Auzon", a débuté en 1902 par le grillage de l'arsénopyrite ou mispickel (FeAsS) provenant des mines environnantes et destiné à la production d'acide arsénieux. Les produits sont utilisés notamment pour le traitement des vignes (As métallique, acides arsénieux, arséniate de soude) et sont présentés sous forme de bouillies métalliques. La production change à partir de 1926 et s'oriente vers la fabrication de produits phytosanitaires avec l'arsalumine (arséniate d'aluminium : AsO_4Al), l'arséniate de plomb, l'arséniate de cuivre et l'arséniate de soude. Ces insecticides et pesticides arsénicaux sont principalement utilisés dans la sylviculture mais aussi pour le traitement de la vigne et des plants de pommes de terre. Ces activités valent à l'usine le surnom de "la Poison", nom donné par les villageois à cause du dépérissement de

certaines vergers aux abords du site (Vialaron, 1998). A partir de 1929, l'activité est superficielle, elle est complètement stoppée à partir de 1932. En 1935, la société "L'Arsenic" reprend l'activité du site avec la fabrication et la commercialisation des produits phytosanitaires. L'arrêt de l'exploitation intervient en 1949 mais la commercialisation des produits se poursuit jusqu'en 1969. Cependant, des stocks de produits chimiques ont subsisté sur le site. En 1985, le BRGM dénombre :

- Produits solides : 300 tonnes environ d'arsalumine + 1 350 kg d'un produit à 32 % d'As + 6 000 kg de sulfate d'alumine hydraté + environ 6 000 kg de silice ou silicates + des quantités en traces d'autres produits ;
- Produits liquides : acide acétique, acide sulfurique, acide chlorhydrique et acide nitrique.

Les produits liquides étaient bien stockés au contraire des produits solides plus dispersés et moins bien conditionnés. Les déchets produits, essentiellement constitués de scories issues du grillage du minerai sur place, de débris et de minerai plus ou moins stérile (BRGM, 2004), ont servi de remblais sur le site au cours des années d'exploitation. Ils contiennent une réserve non négligeable d'As avec une répartition hétérogène sur l'ensemble du site.

En 1992, le site est inscrit au répertoire des sites et sols pollués du Ministère de l'Environnement. Actuellement, le site est une friche industrielle où la plupart des structures sont démolies et où les produits ont été retirés. La proximité de la rivière peut entraîner un transfert des lixiviats issus du site vers des écosystèmes aquatiques.

3. Caractéristiques hydrogéologiques du site atelier

La Vieille Usine d'Auzon est localisée sur les alluvions du ruisseau de l'Auzon et de l'Allier, dans le cône d'épandage qu'ils forment au débouché des gorges à environ 200 m de la confluence entre les deux cours d'eau. Ces alluvions forment un réservoir aquifère exploité, dont le socle cristallin sous-jacent constitue le substratum (Sanjuan *et al.*, 2001). La nappe d'accompagnement de l'Allier s'écoule au sein de ce réservoir, qui s'étend sur une largeur variable, le long du cours d'eau. Les écoulements souterrains au niveau de l'usine convergent très probablement vers l'Allier, en dehors des périodes de crues (BRGM, 2000). Dans un tel contexte la perméabilité de l'aquifère est probablement élevée et permet un transfert rapide

des substances dissoutes. Par ailleurs, le site est situé en zone inondable selon le Plan de Prévention du Risque Inondation de l'Allier (PPRI Allier, Annexe II).

Le socle cristallin du site est constitué de migmatites gneissiques formées pendant le cycle orogénique hercynien (Sanjuan *et al.*, 2001). Les alluvions sont constituées de sables argileux sur les 2-3 premiers mètres, puis de sables grossiers pouvant contenir des galets (Mossmann, 2000).

4. Etude floristique du site atelier

Selon la définition de Braun Blanquet (1928), *"l'association d'espèces est un groupement végétal plus ou moins stable en équilibre avec le milieu ambiant, caractérisée par une composition floristique dans laquelle certains éléments exclusifs indiquent par leur présence une écologie particulière et autonome"*.

Pour caractériser la couverture végétale d'un site contaminé et ainsi permettre l'identification de groupement végétal et d'espèces métallophytes, un relevé floristique a été réalisé sur le site de la Vieille Usine d'Auzon. De même, le couvert végétal du site témoin (AT) a été étudié. Il s'agit d'une prairie permanente située à proximité du site contaminé présentant une végétation en friche à un stade de végétation comparable à la parcelle polluée.

L'enquête phytosociologique a été réalisée selon la méthode sigmatiste (Braun-Blanquet, 1964) sur deux zones floristiquement homogènes, l'une de 250 m² (AT) et l'autre de 600 m² (AP). L'étude se base sur un quadrillage du terrain en placettes de 3 m² (Figure II.3). Les relevés ont été effectués de mai à juin 2008, au cours de la période de végétation optimale. L'identification des espèces est effectuée à l'aide de la "Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique" (Bonnier et De Layens, 1986) et de "l'Atlas de la Flore d'Auvergne" (Antonetti *et al.*, 2006).

La contribution de chaque espèce dans les différents relevés a été évaluée par les coefficients d'abondance / dominance (Braun-Blanquet, 1952), une des notions les plus utilisées en phytosociologie. Le concept d'abondance exprime le nombre d'individus qui forment la population de l'espèce présente dans le relevé. La dominance représente le recouvrement de l'ensemble des individus d'une espèce donnée, comme la projection verticale de leur appareil végétatif aérien sur le sol (Walter, 2006). Le coefficient d'abondance-dominance est estimé visuellement. Son estimation est sujette à une part de subjectivité, qui est cependant négligeable dans l'analyse phytosociologique globale (Meddour, 2011).

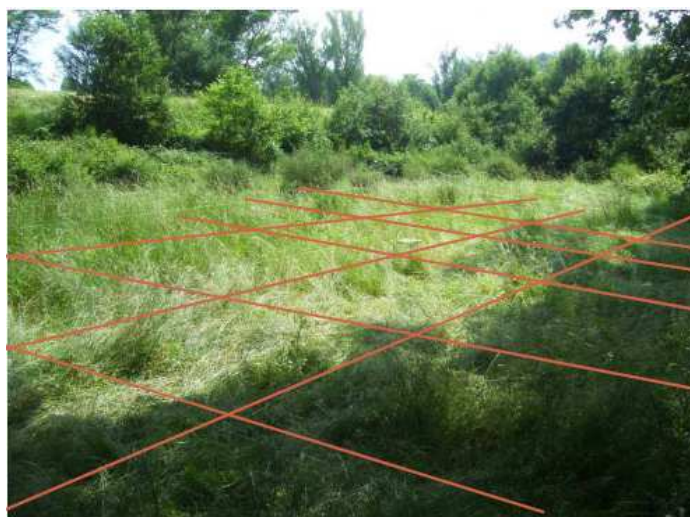


Figure II.3 : Représentation du quadrillage du site en placette de 3 m² (3 m * 1 m) pour l'étude floristique réalisée sur le site d'Auzon par la méthode de Braun - Blanquet.

L'échelle des coefficients d'abondance-dominance (A) de Braun-Blanquet est définie comme suit (Walter 2006) :

- 5 : Recouvrement $> 3/4$ de la surface de référence ($> 75\%$) ;
- 4 : Recouvrement entre $1/2$ et $3/4$ (50-75 % de la surface de référence) ;
- 3 : Recouvrement entre $1/4$ et $1/2$ (25-50 % de la surface de référence) ;
- 2 : Recouvrement entre $1/20$ et $1/4$ (5-25 % de la surface de référence) ;
- 1 : Recouvrement $\leq 1/20$ ($\leq 5\%$ de la surface de référence) ;
- + : Peu d'individus, avec très faible recouvrement.

A partir de l'étude floristique des deux zones, Auzon témoin (AT) et Auzon pollué (AP), différents indices sont calculés renseignant sur la biodiversité de chaque friche.

- L'indice de similarité de Jacquard (J) est une variable statistique permettant d'évaluer la similarité et donc par opposition la diversité de la végétation entre deux échantillons. Pour deux relevés, notés A et B, le calcul de l'Indice de Jacquard ($I_{J(A-B)}$) est le suivant :

$$I_{J(A-B)} = (\text{Nombre d'espèces communes de A et B} / \text{Nombre total d'espèces de A et B}) * 100.$$

- L'indice de Shannon (H'), basé sur la notion d'entropie, permet de mesurer la biodiversité. Il est calculé avec la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

p_i : Proportion d'une espèce i par rapport au nombre total d'espèces (S) dans le milieu d'étude (ou richesse spécifique du milieu).

Les coefficients d'abondance-dominance sont transformés en variable continue comme suit (Leps et Hadincova, 1992) :

A = 5	$p_i = 0,875$
A = 4	$p_i = 0,625$
A = 3	$p_i = 0,375$
A = 2	$p_i = 0,150$
A = 1	$p_i = 0,025$
A = +	$p_i = 0,0125$

- L'indice d'équitabilité (E) permet de comparer des peuplements dont le nombre d'espèces est différent. Il est défini par le rapport entre l'indice de diversité (de Shannon par exemple) et l'indice qui correspondrait à une diversité maximale, c'est-à-dire à un peuplement où toutes les espèces auraient le même effectif (H'max) :

$$H'_{\max} = \ln S$$

$$E = H'/H'_{\max} = H'/\ln S.$$

Chapitre 2 : Analyses des échantillons de sol

1. Protocole d'échantillonnage

Après élimination de la couche 0-5 cm contenant la litière végétale, les prélèvements de sols ont été réalisés, à la pelle à main pour les échantillons destinés aux cultures contrôlées en phytotron (avril, 2008) et à l'aide d'une tarière pour les échantillons destinés à l'étude des

paramètres physico-chimiques et des teneurs en éléments traces dans le sol nécessaire pour le diagnostic du site et le suivi des cultures *in-situ* (printemps, 2010). Ces différentes techniques ont permis de prélever, dans le premier cas, la partie superficielle du sol, entre la surface et 20 cm de profondeur, et dans le second cas, des échantillons ponctuels, entre la surface et jusqu'à 1 m de profondeur dans le but de vérifier l'origine de la contamination. La Figure II.4 représente les zones de prélèvements effectuées pour la culture en condition contrôlée.

Le nombre de répétitions et la répartition des prélèvements ont été définis en fonction de l'utilisation du sol (culture, analyses) et du type d'analyse à réaliser (diagnostic, contrôle, caractérisation). Pour la caractérisation physico-chimique et le diagnostic de la pollution du sol, 5 prélèvements, d'environ 10 kg chacun, répartis sur l'ensemble de la parcelle (Figure II.4) ont été réalisés et rassemblés pour former un échantillon global. A partir de cet échantillon global, 4 échantillons ont été prélevés pour évaluer la pollution et analyser les paramètres physico-chimiques du sol. Le sol est ensuite stocké dans des bidons pour être utilisé lors des cultures sur sol en condition contrôlées. Pour le suivi des paramètres du sol au cours des cultures *in-situ*, 3 prélèvements de sol par parcelle (d'une surface de 10 m²) d'environ 1 kg, ont été effectués à 2 laps de temps différents (avant et après culture) et répartis de façon aléatoire sur la surface de la parcelle. Après culture, le prélèvement a été réalisé au niveau du sol rhizosphérique.



Figure II.4 : Localisation des zones de prélèvements sur le site d'Auzon pollué (AP, en rouge), et sur le site d'Auzon témoin (AT, en jaune), les sigles noir sur le site industriel représente les zones d'études du BRGM.

2. Analyses des paramètres physico-chimiques du sol

2.1. Mesure du pH

Les mesures de pH_{eau} et pH_{KCl} sont effectuées selon la norme ISO 10390 (AFNOR, 1999). Pour le pH_{eau} , 5 g de sol séchés à l'air libre et tamisés à 2 mm sont mis en suspension dans 25 mL d'eau ultra pure agités pendant 1 h sur une table d'agitation à 150 tr.min^{-1} (modèle Fisher Bioblock Scientific), puis laissés au repos pendant 2 h. Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre (modèle Mettler Toledo, seven easy). Le pH_{eau} indique l'acidité réelle et prend en compte les ions H_3O^+ libres dans la solution du sol.

Pour déterminer le pH_{KCl} , le sol est mis en suspension dans 25 mL d'une solution à 1 mol.L^{-1} de KCl. Le pH_{KCl} correspond à la concentration en ion H_3O^+ du sol obtenue après ajout de KCl. Le KCl a pour effet de libérer les H^+ fixés sur le complexe argilo-humique, ce qui permet de déterminer l'acidité totale ou acidité de réserve du sol.

2.2. Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC)

La CEC représente la quantité totale de cations échangeables que le sol peut adsorber. La CEC a été déterminée par la méthode au chlorure de cobaltihexammine ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$) selon la norme NF X 31-130 (AFNOR, 1999). Le principe de cette méthode repose sur le fait que les ions cobaltihexammine ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) s'adsorbent à la surface du sol et déplacent ainsi les cations retenus par le sol. Pour cela, 2,5 g de sol tamisés à 2 mm sont mis en suspension dans 50 mL d'une solution de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ à $0,016 \text{ mol.L}^{-1}$, agités pendant 2 h sur une table d'agitation à 150 tr.min^{-1} (modèle Fisher Bioblock de type SM30B), centrifugés 15 mn à 3 000 g (centrifugeuse Beckman type CH-J2MC), puis filtrés (filtres Whatman 0,45 μm membrane en ester de cellulose). Les ions $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ présents, en excès, dans la solution sont ensuite déterminés par colorimétrie à 470 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Perkin-Elmer Lambda 2S UV/VIS). La CEC est exprimée en $\text{meq}/100 \text{ g}$ de sol ($1 \text{ meq}/100 \text{ g de sol} = 1 \text{ cmol}^+.\text{kg}^{-1}$).

2.3. Granulométrie

La granulométrie a été déterminée en suivant la norme NF X 31-107 (AFNOR, 2004). Cette analyse a été effectuée par le Laboratoire d'analyses des sols de l'INRA (Arras, 62). Cette norme permet une détermination de la distribution granulométrique en cinq fractions. Il s'agit des argiles ($< 2 \mu\text{m}$), des limons fins (de 2 à $20 \mu\text{m}$), des limons grossiers (de 20 à $50 \mu\text{m}$), des sables fins (de 50 à $200 \mu\text{m}$) et des sables grossiers (de 200 à $2\,000 \mu\text{m}$). Les résultats sont exprimés par rapport à la phase minérale (somme des 5 fractions = 1 000). Les résultats obtenus ont permis la caractérisation de la texture des sols par le diagramme du GEPPA (Groupe d'Etudes des Problèmes de Pédologie Appliquée) (Mathieu, 1998).

2.4. Teneur en carbone organique

La teneur en carbone organique a été déterminée selon la norme ISO 14235 (AFNOR, 1999). Il s'agit d'une oxydation du carbone organique du sol par le bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en excès, en milieu acide (H_2SO_4), et à chaud. Le chrome VI est réduit par le carbone organique en chrome III. Le Cr(VI) restant est ensuite dosé. Pour cela, 250 mg de sol de particules inférieures à 2 mm sont mélangés à 5 mL d'une solution de bichromate de potassium à 8 % et à 7,5 mL d'acide sulfurique concentré. Après une centrifugation de 10 mn à 3 000 g (Beckman type CH-J2MC) et une filtration (filtre Whatman $0,45 \mu\text{m}$, membrane en ester de cellulose), le Cr(VI) est dosé à 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Perkin-Elmer Lambda 2S UV-VIS). Une courbe d'étalonnage est réalisée, elle est établie à partir de glucose, qui subit le même protocole que le sol. L'évaluation de la teneur en matière organique de l'échantillon s'effectue par application d'un facteur de conversion ($f = 1,73$) à la teneur en carbone obtenue. Ce facteur dépend du type de matière organique présente et peut varier de 1,7 à 2,5 pour les sols agricoles.

2.5. Teneur en azote total

La teneur en azote total a été déterminée selon la norme ISO 11261 (AFNOR, 1999). Il s'agit d'une méthode Kjeldahl modifiée qui permet de doser l'azote sous ses formes ammonium, nitrate, nitrite et organique. 0,5 g de sol de particules $< 250 \mu\text{m}$ sont minéralisés dans 7 mL d'acide salicylique/sulfurique (25 g.L^{-1} dans H_2SO_4), 0,5 g de thiosulfate de sodium, et en présence d'un mélange catalytique ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Se}$) et de quelques

billes de verre (régulateur d'ébullition). Le mélange est chauffé à reflux à faible ébullition pendant environ 2 h. Le minéralisat est distillé après ajout de 50 mL d'eau et 50 mL de soude à 30 %, cet ajout permet de neutraliser l'acide ajouté dans la phase de minéralisation et d'atteindre un pH proche de 14 ou l'ion ammonium est totalement transformé en ammoniac. Le distillat est récupéré, et après ajout de quelques gouttes de l'indicateur de Tashiro, il est titré avec de l'acide chlorhydrique à 0,05 mol.L⁻¹.

2.6. Teneur en phosphore soluble

La mesure du phosphore soluble dans le sol est réalisée selon la norme NF X 31-161 (AFNOR, 1999). Elle consiste à l'extraction des formes solubles du phosphore contenu dans le sol par la méthode de Joret-Hébert. Un échantillon de sol de 1 g broyé en particules fines (< 250 µm) est introduit dans un tube avec 25 mL de solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 0,1 mol.L⁻¹ et pH 7. Le flacon fermé est agité pendant 2 h à 150 tr.min⁻¹ (table d'agitation Fisher Bioblock de type SM30B) puis filtré (filtres Whatman 0,45 µm membrane en ester de cellulose) afin d'obtenir un extrait limpide. Dans chaque tube, 9 mL de réactif de coloration (solution sulfomolybdique contenant du thiosulfate de sodium, du formol et de l'acide ascorbique) sont ajoutés, le mélange est ensuite homogénéisé et chauffé à 75 °C pendant 30 min. Après refroidissement, une mesure de l'absorption à 825 nm est réalisée (Spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 2S UV/VIS).

Chapitre III : Matériel végétal et conditions de culture



1. Description des espèces végétales sélectionnées

1.1. Agrostis capillaris L.

Agrostis capillaris ou l'Agrostide commune comme beaucoup d'autres membres du genre *Agrostis*, est une espèce à intérêt agronomique faible à moyen en raison de sa faible production et de sa digestibilité plus stable au cours de la saison pour les animaux de pâturage (Jouven, 2006). D'autre part, elle est capable de se développer sur des sols acides et

relativement pauvres et résiste aux périodes de sécheresse (Coronel, 2005). La présentation de l'espèce est détaillée dans le Tableau II.1.

Tableau II.1 : Présentation de l'Agrostide commune, *Agrostis capillaris* L.


Famille	Poaceae	  Lindsey, 2005 et 2006
Espèce	<i>Agrostis capillaris</i> Synonyme : <i>A. tenuis</i>	
Type	Monocotylédone, C3	
Origine	Europe - Asie	
Généralités	Plante herbacée pérenne Espèce invasive Hauteur 10 à 80 cm Croissance rapide Profondeur des racines jusqu'à 65 cm Types de sol : texture sableuse, limoneuse ou limoneux-sableuse, pH 4,9 - 7,5	

Cette espèce a été choisie pour sa capacité à tolérer et à accumuler en quantité importante l'As, jusqu'à 1 g.kg⁻¹ (Wang et Mulligan, 2006). De plus, l'étude floristique préliminaire du site d'Auzon a montré que cette espèce est la plus abondante sur la zone prairiale du site pollué.

1.2. *Solanum nigrum* L.

Cette espèce est présente sur le site de la Vieille Usine d'Auzon en Haute Loire, sa présentation est détaillée dans le Tableau II.2. Par ailleurs, elle est connue comme étant hyperaccumulatrice de cadmium (Sun *et al.*, 2008 ; Ji *et al.*, 2011). L'importance de sa biomasse aérienne fait d'elle une espèce intéressante dans le cas d'un procédé de phytoremédiation de sites contaminés aux éléments traces.

Tableau II.2 : Présentation de la Morelle noire, *Solanum nigrum* L.

Famille	Solanaceae	
Espèce	<i>Solanum nigrum</i> L.	
Type	Dicotylédone, C3	
Origine	Large répartition notamment en Europe, milieu tempéré	
Généralités	Plante herbacée annuelle Adventice Hauteur 10 à 60 cm Plante diurétique et narcotique Fruits toxiques Espèce relativement ubiquiste, préférence pour les sols légers Plante indicatrice des sols riches en azote (Andrès, 2005)	

King Saud University, 2007

1.3. *Vicia faba* L.


C'est une plante herbacée annuelle peu exigeante, avec un fort développement foliaire et présente dans les régions tempérées (Tableau II.3). Elle est originaire du Moyen-Orient mais sa culture s'effectue de nos jours dans le monde entier. Les températures élevées lui sont favorables et son développement est arborescent dans les pays chauds. Elle n'est pas présente à l'état sauvage.

Robuste, facile à se procurer et à faire germer, la fève permet, par la rapidité de sa germination et de sa croissance, de disposer très facilement de jeunes pousses dont les racines secondaires seront utilisables pour les tests de génotoxicité au bout d'une dizaine de jours seulement. De plus, cette plante, utilisée aussi en agriculture, peut pousser sur des sols de différentes natures, d'où son intérêt dans les expériences de terrain.

Par ailleurs, la fève est très sensible à la pollution du sol, ce qui en fait un modèle végétal très utilisé en écotoxicologie. La simplicité de son caryotype l'a faite élire pour un grand nombre d'études de mutagénèse par le test des aberrations chromosomiques (De Marco *et al.*, 1995 ; Sang & Li, 2004). Elle est ainsi l'un des modèles les plus utilisés dans le test des micronoyaux (Sougir *et al.*, 2008 ; Marcato-Romain *et al.*, 2009 ; Khadra *et al.*, 2012), et dans

le test des comètes (Lin *et al.* 2007 ; Pourrut, 2008 ; Foltete, 2010). *Vicia faba* est en outre aussi employée pour étudier les réponses des marqueurs du stress oxydant (Radetski *et al.*, 2004) et de chélation d'ETM par les phytochélatines (Béraud, 2007).

Tableau II.3 : Présentation de la Fèverolle, *Vicia faba* L.

Famille	Fabaceae	
Espèce	<i>Vicia faba</i>	
Type	Dicotylédone, C3	
Origine	Europe, région tempérée	
Généralités	Plante herbacée annuelle Plante cultivée, absente à l'état sauvage Cultivée dans le monde entier Jusqu'à 1 m de hauteur Tous types de sol	

Kempay, 2007

1.4. *Cannabis sativa* L.


C'est une plante herbacée annuelle (Tableau II.4). Elle présente une croissance importante et peut atteindre plusieurs mètres en quelques mois. Les folioles de ses feuilles sont fines. Son cycle de vie est plus long que celui des autres sous-espèces, sans doute à cause de la photopériode des régions équatoriales. Plante à racine pivotante, sa tige est souple et creuse. C'est une plante rudérale et robuste, sa culture en Europe ne nécessite généralement l'emploi d'aucun pesticide (Wertz et Vanderghem, 2011). C'est en revanche une culture qui nécessite des amendements en potassium et en azote.

Le chanvre fut très largement utilisé par le passé et il côtoie l'être humain depuis le néolithique. Il a toutefois peu à peu été interdit ou fortement réglementé au cours du XX^e siècle en raison de ses propriétés psychotropes. Le chanvre est réputé pour ses graines (appelées chènevis) fournissant une huile siccative ou pour ses fibres longues et solides, tolérantes à l'humidité, issues de la partie périphérique de la tige et produisant la filasse. Le chanvre connaît de multiples utilisations, telles les textile, la construction, les cosmétiques, l'isolation phonique et thermique, la fabrication d'huiles, de cordages, de litières, l'utilisation

sous forme de combustibles, en papeterie, pour l'alimentation humaine, l'alimentation animale, comme biocarburants, pour des usages médicamenteux, pour un usage récréatif ou comme matériaux composites en association avec des matières plastiques. La filière chanvre trouve un regain d'intérêt avec la baisse en ressources des énergies fossiles et la prise de conscience environnementale. Dans ce contexte, les semenciers de l'Union Européenne travaillent à la création de cultivars qui constituent le chanvre cultivé légalement en France. Ces cultivars font l'objet d'un programme de sélection génétique intensif afin de minimiser leur teneur en THC.

C'est dans un contexte de valorisation de sa biomasse aérienne, que des études ont été menées ces dix dernières années sur l'utilisation du chanvre cultivé en phytoremédiation (Linger *et al.*, 2002 ; Meers *et al.*, 2005 ; Shi et Cai, 2009 ; Shi *et al.*, 2011).

Tableau II.4 : Présentation du Chanvre cultivé, *Cannabis sativa* L.

Famille	Cannabaceae	
Espèce	<i>Cannabis sativa</i> subsp. <i>sativa</i>	
Type	Dicotylédone, C3	
Origine	Région équatoriale, Asie	
Généralités	Plante herbacée annuelle Plante cultivée en Europe et en Asie Jusqu'à 5 m de hauteur Produit une substance psychotrope le Tétrahydrocannabinol (THC) < 0.3 % pour le chanvre cultivé Biomasse aérienne à intérêt	

Austruy (2010)

2. Germination des graines

Les graines d'*A. capillaris* et *S. nigrum* ont été fournies par le Jardin Botanique de Clermont-Ferrand. Les graines de *V. faba*, variété Aguadulce, sont des semences issues de l'agriculture biologique (certifié ECOCERT) produites par l'entreprise Ducrettet. Enfin, les

graines de *C. sativa*, variété Fédora 17, ont été fournies par l'Institut Technique du Chanvre (ITC, Annexe IV).

Au préalable, les graines de *V. faba*, sont placées dans de l'eau distillée pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite plongées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 20 min pour éliminer toutes contaminations fongiques, puis rincées abondamment à l'eau distillée.

Les graines des quatre espèces végétales ont été mises à germer dans des bacs entre feuilles de papiers imbibées quotidiennement avec de l'eau distillée et recouvert d'un film plastique pour conserver une humidité constante. Les bacs de germination sont ensuite placés à l'obscurité à une température de 23 ± 2 °C pendant quelques jours.

3. Culture des plantes sur sol

A l'apparition de la racine et des cotylédons, les plantules sont transférées dans un dispositif hydroponique. Chaque plantule est placée dans un pot de 1 L contenant un support solide inerte, la perlite. Un apport de solution nutritive d'Hoagland (Gamborg et Wetter, 1975) (Annexe III) est effectué quotidiennement afin d'aboutir à un développement foliaire et racinaire permettant leur transfert sur les sols d'études. La culture des plantes des différentes espèces a été effectuée dans une chambre de culture à une température de 23 ± 1 °C le jour et 18 ± 1 °C la nuit, une photopériode de 16h / 8h (jour / nuit), une intensité lumineuse de $350 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mesurée au niveau du collet (lampes OSRAM, VIALOX®, NAV-T 400 W) et une hygrométrie de 60 ± 5 %. Après 15 jours de culture sur perlite (5^{ème} - 6^{ème} étage foliaire), les plantes ont été mises en contact des sols d'étude et arrosées régulièrement avec de l'eau distillée.

Au cours de cette étude, trois types de sols ont été utilisés :

- Sol prélevé sur une prairie témoin proche d'Auzon (AT) ;
- Sol prélevé sur le site de la friche industrielle d'Auzon (AP) ;
- Un terreau horticole de marque Vilmorin. C'est un sol témoin (T) exempt de toute pollution et réunissant les paramètres agronomiques nécessaires pour un développement optimal des plantes.

Pour la mise en culture, le sol a été préalablement séché à température ambiante et tamisé à 2 mm, 1 kg de sol a ensuite été placé dans des sacs plastiques introduits dans des pots

de culture de 1 L afin d'éviter toutes pertes minérales ou métalliques par lessivage. Les plantes sont récoltées après 1 mois de culture sur sol.

8 répétitions par condition de culture et par espèce végétale ont été effectuées. Celles-ci ont permis de réaliser 8 répétitions des mesures physiologiques et biochimiques par condition et par espèce végétale. Pour l'analyse des teneurs en ETM dans le sol et les plantes, seuls 4 échantillons par condition ont été réalisés, chacun étant composé de deux individus par condition.

4. Culture des plantes en hydroponie totale



Figure II.5 : Culture de *Vicia faba* en hydroponie totale en condition contrôlée (Austruy, 2009).

Seules *V. faba* et *S. nigrum* ont été sélectionnées pour cette expérience. De même que pour la culture sur sol, après la germination, les plantules ont été transférées sur un substrat inerte, la perlite, afin d'obtenir un développement foliaire et racinaire suffisant pour leur transfert en hydroponie totale (5^{ème} - 6^{ème} étage foliaire). Après 15 jours de culture, les plantes sont introduites dans des bacs de 15 L, 8 plantes par bac, contenant de la solution nutritive d'Hoagland (Annexe III) continuellement aérée par des pompes (Rena Air 50, 70 L.h⁻¹) (Figure II.5). La solution est changée deux fois par semaine.

Après une période d'acclimatation d'une semaine, 5 plantules par condition, homogènes et âgées de 21 jours, sont sélectionnées et soumises à un traitement métallique par l'ajout d'As (III) ou d'As (V) à différentes concentrations (Tableau II.5).

Tableau II.5 : Concentrations en As(III) et en As(V) dans la solution nutritive pendant la période de stress.

	[As(III)] $\mu\text{mol.L}^{-1}$	[As(V)] $\mu\text{mol.L}^{-1}$
C₀	0	0
C₁	25	75
C₂	50	150
C₃	75	300

Cette expérience a été effectuée en condition contrôlée, les paramètres de cultures (photopériode, température, humidité, intensité lumineuse) sont identiques à ceux appliqués lors de la culture sur sol. La durée du traitement s'est étalée sur 14 jours.

5. Récolte et conditionnement du matériel

Lors de cette étape, les différents tissus végétaux (feuilles et racines) ont été prélevés, séparés et conditionnés en fonction des analyses à réaliser.

Pour l'analyse des éléments traces, les feuilles ont été rincées trois fois à l'eau distillée. Les racines ont été nettoyées soigneusement à l'eau distillée puis passer 2 minutes dans la cuve à ultrasons (PROLABO, 50-60 Hz) pour détacher les particules de terres adsorbées aux systèmes racinaires. Par la suite, les tissus végétaux séparés ont été mis à sécher à l'étuve à 65 °C jusqu'à observer une perte de masse inférieure à 5 % en 24 h.

Pour mesurer les réponses biochimiques des plantes suite à un stress métallique, les tissus végétaux sont prélevés et séparés, les racines sont rincées trois fois à l'eau distillée et l'ensemble des tissus sont congelés dans l'azote liquide puis stockés à - 80 ° C.

Chapitre IV : Dosage des teneurs totales et disponibles en ETM dans les échantillons de sols et de végétaux

1. Préparation du matériel et conditions d'expérience

L'ensemble des expériences a été réalisé à température ambiante, 20 ± 2 °C. Les solutions ont été préparées avec de l'eau ultra pure produite par un système "Easy PureTM UV", qui présente une résistivité de $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ et une concentration en carbone organique inférieure à $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les réactifs utilisés sont de qualité analytique et sont compatibles avec l'analyse des métaux traces. L'ensemble du matériel (verrerie, flacons en polyéthylène...) est systématiquement décontaminé au moyen d'acide nitrique à 7 % pendant 1 h puis mis à tremper dans un bain d'eau distillée et rincé à l'eau ultra pure, afin d'éviter toute contamination. De plus, pour chaque expérimentation, la préparation de blancs (réactifs sans échantillon de sol) a été systématique afin de vérifier l'absence de contamination pendant l'analyse.

2. Echantillons de sol

Le pré-traitement des échantillons de sols (NF ISO 11464, AFNOR, 1999) pour le dosage des éléments traces consiste à sécher les échantillons à température ambiante jusqu'à une perte de masse inférieure à 5 % en 24 h. L'échantillon est ensuite homogénéisé, émotté et l'échantillon global est séparé en deux fractions, les particules supérieures à 2 mm et la fraction inférieure à 2 mm. Cette dernière fraction est homogénéisée puis divisée en sous-échantillon par la méthode de quartage pour obtenir environ 5 g de sol qui sont ensuite broyés en particules inférieures à $63 \text{ }\mu\text{m}$.

2.1. Minéralisation à l'eau régale pour le dosage des teneurs totales

Pour la mise en solution des éléments traces métalliques et métalloïdes, 0,5 g de sol sec broyés en particules inférieures à $63 \text{ }\mu\text{m}$ sont minéralisés à l'eau régale selon le protocole adapté de Myöhänen *et al.* (2002). L'échantillon de sol est introduit dans un matras avec 3 mL d'acide nitrique à 68 % puis chauffer à 70 °C pendant 1 h. 9 mL d'acide chlorhydrique à 37 % sont ajoutés puis le mélange est laissé dégazer sous hotte pendant 12 h. Il est ensuite chauffé à

reflux à 150 °C pendant 3 h tout en contrôlant l'ébullition et en agitant régulièrement, pour éviter la perte de composés, notamment arséniés, par volatilisation. Après refroidissement, le mélange est filtré (filtre papier Whatman 50 plat, 110 mm), puis transféré dans une fiole jaugée de 50 mL et ajusté au trait de jauge à température ambiante avec de l'eau ultra pure. La solution obtenue est transvasée dans un tube de 50 mL et conservée à 4 °C.

Un blanc est réalisé pour chaque série de minéralisation.

2.2. Extraction des ETM au CaCl_2 à $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$

L'utilisation du chlorure de calcium pour évaluer la biodisponibilité des éléments traces métalliques et métalloïdes dans les sols a fait l'objet de nombreuses publications (Lebourg *et al.*, 1996 ; Cornu et Clozel, 2000). Cette extraction au sel neutre vise à quantifier la fraction mobile de la pollution et elle est représentative des conditions intrinsèques du sol en terme de force ionique (Moszkowicz, 2002). Ainsi, selon Menzies et son équipe (2007), elle donne la meilleure indication en termes de phytodisponibilité. Cette méthode d'extraction, développée initialement par Houba et son équipe (1990), est normalisée au Pays Bas depuis 1996 (NEN 5704).

La prise d'essai est de 2,5 g de sol broyé en particules inférieures à 63 μm , elle est mise en suspension dans 25 mL de solution de CaCl_2 à $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ et le mélange est agité à 150 tr.min^{-1} (table d'agitation Fisher Bioblock de type SM30B) pendant 3 h à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Après décantation de la suspension, le pH est mesuré. L'extrait est séparé du réseau solide par centrifugation à 3 000 g pendant 10 min (Beckman type CH-J2MC). Le surnageant est filtré (filtres Whatman 0,45 μm membrane en ester de cellulose) et conditionné à 4 °C dans des tubes de 50 mL.

Pour chaque série d'analyse, un blanc est réalisé.

2.3. Extractions séquentielles sélectives de l'arsenic

La mobilité et la biodisponibilité des ETM dans les sols dépendent de leur réactivité avec les constituants du sol et en particulier de leur localisation dans les différentes fractions du sol (El Mufleh *et al.*, 2010). La caractérisation des ETM dans les sols doit aller au delà d'une simple détermination de leur teneur totale. Ainsi, le fractionnement des ETM dans un sol est nécessaire et peut être effectuée en utilisant des méthodes physiques ou chimiques (Cornu et Clozel, 2000). Les méthodes chimiques sont plus sensibles et consistent en

l'utilisation de différents réactifs d'extraction des métaux. Malgré les critiques, les extractions séquentielles restent le type de méthode le plus utilisé pour la localisation des ETM sur les phases porteuses du sol. Le protocole appliqué dans ce travail est proposé par le Bureau Communautaire de Référence (BCR) qui définit un schéma opérationnel en quatre étapes (Rauret *et al.*, 1999). Selon cette procédure, la première fraction dite « extractible » est la fraction des métaux faiblement liée aux argiles (fraction échangeable et acido-soluble), aux phases amorphes et aux fractions carbonatées, la seconde fraction dite « réductible » est liée aux oxydes métalliques et la troisième fraction dite « oxydable » est liée à la matière organique. La fraction restante est qualifiée de fraction résiduelle.

0,5 g de sols sont broyés en particules fines inférieures à 63 μm et traités selon le protocole d'extraction séquentielle accéléré par ultrason élaboré par Pérez-Cid et son équipe (1999). L'extraction a été réalisée à l'aide d'une sonde à sonication de 60 W (Bandelin, modèle HD 70). La procédure est réalisée en quatre étapes successives (Rauret *et al.*, 1999), elle est détaillée dans le Tableau II.6.

Tableau II.6 : Protocoles des extractions séquentielles accélérées par ultrasons.

Fractions	Réactifs utilisés	Temps et puissance de sonication
R1 : fraction échangeable et acido-soluble	20 mL CH_3COOH à $0,11 \text{ mol.L}^{-1}$	7 mn, 20 W
R2 : fraction réductible	20 mL $\text{NH}_2\text{OH-HCl}$ à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (ajusté à pH 2 avec HNO_3)	7 mn, 20 W
R3 : fraction oxydable	10 mL H_2O_2 (30 %) 25 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ à 1 mol.L^{-1} (ajusté à pH 2 avec HNO_3)	2 mn, 20 W 6 mn, 20 W
R4 : fraction résiduelle	9 mL HNO_3 (69 %) et 3 mL HCl (37 %)	Digestion par micro-ondes

Chaque échantillon a été centrifugé à 3 000 g pendant 15 minutes (Beckman type CH-J2MC) et filtré à l'aide de filtres seringues de 0,45 μm de diamètre de pores (Sartorius, Minisart stérile).

Un blanc par fraction est réalisé. La qualité des résultats a été évaluée en comparant la somme des teneurs en As obtenues pour chaque fraction à la teneur totale de l'As mesurée dans l'échantillon de sol. Les résultats sont considérés comme satisfaisants lorsque la somme des fractions recouvre 90 à 120 % de la teneur totale.

3. Echantillons de végétaux

Afin d'effectuer le dosage des éléments traces dans les échantillons de végétaux, les échantillons sont minéralisés, suivant une technique inspirée par celle proposée par Barbaste (2004).

Les échantillons de feuilles et de racines sont récoltés et séparés en deux fractions distinctes. Ils sont ensuite mis à sécher dans une étuve à 65 °C jusqu'à ce que la perte de masse soit inférieure à 5 % en 24 h (environ 72 heures de séchage).

Les échantillons secs sont ensuite broyés manuellement ou à l'aide d'un broyeur à température ambiante jusqu'à obtenir des particules de diamètre inférieur à 500 µm.

La minéralisation est réalisée sur au moins 0,2 g de matière sèche. Le matériel végétal broyé est pesé avec précision et introduit dans un matras avec 5 mL d'acide nitrique à 68 % et 5 mL de peroxyde d'hydrogène à 30 %. L'échantillon est laissé dégazer 12 h sous hotte aspirante puis chauffé à 95 °C pendant 1 h puis à 150 °C pendant 2 h. Après refroidissement, l'échantillon est filtré sur papier Whatman (filtre papier Whatman 50 plat, 110 mm) et transféré dans une fiole jaugée de 50 mL complétée au trait de jauge à température ambiante avec de l'eau ultra pure. La solution est transvasée dans un tube de 50 mL et conservée à 4 °C. Un blanc est réalisé pour chaque série de minéralisation.

Pour le contrôle de la qualité de la mise en solution et de l'analyse des échantillons de plantes, le standard certifié CTA-OTL1 provenant de l'Institut Bulgare de Protection des Plantes a été inclus dans les séries d'analyses.

A partir des teneurs mesurées dans les différents organes des plantes et des teneurs relevées dans le sol deux variables ont été calculées, le Facteur de Bioaccumulation (FB) et le Facteur de Translocation (FT).

- Le FB renseigne sur la capacité de la plante à extraire puis à accumuler l'As présent dans le sol ;
- Le FT représente le transfert du polluant des racines vers les parties aériennes de la plante. Il est calculé à partir des concentrations en As mesurées dans les différents organes de la plante.

$$FB = \frac{[As]_{\text{plante}} (\text{mg.kg}^{-1} \text{ MS})}{[As]_{\text{sol}} (\text{mg.kg}^{-1} \text{ MS})}$$

$$FT = \frac{[As]_{\text{feuille}} (\text{mg.kg}^{-1} \text{ MS})}{[As]_{\text{racine}} (\text{mg.kg}^{-1} \text{ MS})}$$

4. Méthodes de dosage des ETM

Pour le dosage des éléments traces dans les solutions issues des extractions décrites précédemment (Chapitre II.4.2 et II.4.3), deux procédés distincts ont été utilisés :

- Spectrométrie d'Absorption Atomique four graphite (Varian SpectrAA 800), réalisée au Laboratoire GRESE de l'Université de Limoges.
- Spectrométrie d'Emission Atomique par torche à plasma (ICP AES - Jobin-Yvon ULTIMA C spectrometer) réalisée au laboratoire GENERIC du centre SPIN de l'Ecole des Mines de St Etienne.

La spectrométrie atomique étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre, c'est-à-dire lorsque celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre.

Dans le cadre de l'expérimentation *in-situ* de phytostabilisation sur le site de la Vieille Usine d'Auzon, les teneurs en ETM des échantillons de sol non minéralisés ont été analysées avec un spectromètre portable de fluorescence X (Niton XL723S). Ces analyses ont été réalisées en association avec l'Unité Ecotechnologies du Service Environnement et Procédés du BRGM d'Orléans.

4.1. Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA)

La spectrométrie par absorption permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques à l'état de traces ($\mu\text{g.L}^{-1}$) préférentiellement en solution. Un seul élément peut être analysé simultanément. L'analyse se base sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental, chaque atome à doser ayant un faisceau d'intensité connue et une longueur d'onde caractéristique. Dans son principe, la spectrométrie SAA consiste à vaporiser l'échantillon liquide et à le chauffer à l'aide d'une flamme ou d'un four. Un rayonnement défini par une fréquence propre à l'élément analysé est envoyé, l'absorption du rayonnement par les atomes présents est proportionnelle à la concentration de l'élément considéré.

La méthode est quantitative et relative, une gamme d'étalonnage est donc nécessaire et est spécifique pour chaque élément (10 à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'As). De ce fait, avant l'analyse des teneurs en éléments traces, les échantillons sont donc préalablement dilués pour que la concentration de l'élément soit comprise dans la gamme d'étalonnage.

La spectrométrie SAA a notamment été utilisée pour doser l'As dans les échantillons de sol et de végétaux minéralisés prélevés lors des cultures de plantes en condition contrôlée.

Ces échantillons ont été analysés par SAA en four graphite avec une correction Zeeman du signal de fond (Varian SpectrAA 880 Z).

4.2. Spectrométrie d'Emission Atomique (AES)

L'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma / Atomic Emission Spectrometry) est une méthode d'analyse par spectrométrie d'émission atomique dont la source est un plasma généré par couplage inductif. Cette technique permet l'analyse en solution de près de 70 éléments du tableau périodique, à des concentrations allant des traces (ppb voire ppt) au %.

Dans le cas de l'absorption (SAA), un faisceau d'intensité connue et de longueur d'onde bien choisie est envoyé sur les atomes à doser. L'intensité transmise est ensuite mesurée, pour en déduire le nombre d'atomes absorbants présents dans la flamme ou le four graphite, les atomes dosés étant en large majorité à l'état fondamental. En émission (AES), les atomes sont excités thermiquement, dans la flamme ou le plasma afin qu'ils réémettent leur spectre de raies. En étudiant les spectres détectés, on peut donc voir les éléments constituant l'échantillon (à condition d'avoir une température suffisamment élevée pour exciter tous les atomes), et évaluer leur quantité grâce à l'intensité des raies. En effet, un atome possède un grand nombre de niveaux d'énergie possibles. Une raie spectrale résulte d'une transition électronique entre certains de ces niveaux. Lorsque un atome est excité, c'est à dire qu'un électron d'une couche donnée de l'atome est éjecté sur un niveau d'énergie supérieure, il est considéré comme instable et tend à revenir ensuite, en une ou plusieurs étapes, à sa configuration d'énergie fondamentale. A chaque transition électronique correspond l'émission d'une énergie sous la forme d'un rayonnement lumineux dont la fréquence est spécifique de l'élément et de la transition considérée, phénomène appelé raie d'émission d'un élément.

Le plasma, gaz atomique chargé, mélange d'ions et d'électrons, constitue des sources de températures plus élevées que celles produites par les flammes et autres décharges (6 500 à 10 000 °C contre 1 700 à 3 150 °C pour la flamme) (Mermet *et al.*, 2007). Il permet d'atteindre facilement les températures d'atomisation des molécules et les énergies d'ionisation et d'excitation des atomes. Son rôle, dans l'analyse par émission, est de casser les liaisons moléculaires pour produire des ions et atomes libres et d'exciter ces particules (Mermet *et al.*, 2007). Le gaz utilisé dans l'analyse ICP-AES est l'argon. C'est un gaz rare monochromatique qui présente un spectre simple et ne se recombine pas avec les espèces chimiques de façon stable.

Un étalonnage de l'appareil est réalisé à partir de deux points :

- Un point zéro correspondant à une solution réputée pure, et de même acidité que les échantillons analysés ;
- Un point haut, correspondant à une solution contenant des teneurs moyennes dans les différents éléments recherchés dans une matrice de même acidité que les échantillons.

Les teneurs des éléments mesurées dans la deuxième solution étalon peuvent être utilisées pour corriger les interférences entre pics.

Cette technique a été utilisée lors de l'expérimentation *in-situ* pour l'analyse des échantillons de sol extrait au CaCl_2 ainsi que pour l'analyse des teneurs en ETM dans les végétaux.

4.3. Spectrométrie de fluorescence X

Tableau II.7. Limites de détection du spectromètre portable de fluorescence X pour les différents ETM étudiés et le Fe (mg.kg^{-1}) (Laperche, 2005).

<i>Eléments analysés</i>	<i>Limites de détection (mg.kg^{-1})</i>
As	10
Sb	45
Pb	10
Cu	50
Cd	25
Fe	200

Les teneurs totales des ETM en excès des différentes parcelles installées sur Auzon témoin (AT) et pollué (AP) ont été mesurées à l'aide d'un spectromètre portable de fluorescence X (Niton XL723S). Ces analyses ont été réalisées sur des échantillons de sols broyés en particules fines (inférieures à $0,63 \mu\text{m}$) et conditionnés dans des coupelles en plastique (Chemplex Industries, Inc.) recouverte d'un film de Mylar de $6 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Le temps de mesure est estimé à deux minutes par échantillon. La limite de détection est variable en fonction de l'élément étudié (Tableau II.7).

Ces mesures ont permis de cartographier la pollution en As sur la parcelle 227 du site de la Vieille Usine d'Auzon.

Chapitre V : Analyses physiologiques et biochimiques sur les plantes

1. Mesure de la biomasse végétale et de la teneur en eau

Après la récolte des plantes, la biomasse aérienne et racinaire a été déterminée. Plusieurs paramètres ont été étudiés, les échantillons de feuilles et racines ont été pesés pour déterminer leurs masses fraîches. De même, la longueur de la tige, le nombre de feuilles et de nœuds ont été mesurés avant le séchage du matériel végétal.

La teneur en eau a été calculée à partir de la masse fraîche et de la masse sèche déterminée à la suite du séchage, selon le calcul suivant :

$$TE = \frac{MF - MS}{MF} \times 100$$

TE : Teneur en Eau

MF : Masse Fraîche

MS : Masse sèche

8 échantillons par condition et par espèce ont été analysés pour la culture sur sol en condition contrôlée. Pour la culture hydroponique, les analyses ont été réalisées sur 5 échantillons.

2. Dosage des teneurs en pigments photorécepteurs

Pour l'extraction des chlorophylles totales, environ 0,5 g de matériel végétal congelé est broyé dans l'azote liquide et à l'obscurité en présence de carbonate de calcium pour maintenir le pH de l'échantillon. Le broyat est ensuite transféré dans un tube à centrifuger avec 25 mL d'acétone à 80 % permettant la mise en solution des pigments. Les échantillons sont conservés 5 h dans la glace à l'obscurité puis centrifugés à 1 500 g pendant 10 min à 4 °C (Beckman type CH-J2MC). La densité optique est mesurée à 460, 646,6 et 663,6 avec un spectrophotomètre UV/VIS (Perkin-Elmer, Lambda 2S). Les concentrations en caroténoïdes et en chlorophylles *a*, *b* et totales sont calculées en utilisant les équations de Porra (2002) :

$$\text{Chlorophylle } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = (12,25 \times \text{DO}_{663,6}) - (2,55 \times \text{DO}_{646,6}) \quad (1)$$

$$\text{Chlorophylle } b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = (20,31 \times \text{DO}_{646,6}) - (4,91 \times \text{DO}_{663,6}) \quad (2)$$

$$\text{Chl } a + b \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = (17,76 \times \text{DO}_{646,6}) + (7,34 \times \text{DO}_{663,6}) \quad (3)$$

$$\text{Caroténoïdes (mg.L}^{-1}\text{)} = 5 \times \text{DO}_{460} - ((3,19 \times \text{Chla} + 130,3 \times \text{Chlb}) / 200) \quad (4)$$

Pour chacun de ces paramètres, 8 répétitions ont été réalisées pour chaque condition de culture sur sol. Lors des expérimentations en hydroponie, 5 répétitions par condition de culture ont été effectuées.

3. Mesure des échanges gazeux photosynthétiques

3.1. Paramètres mesurés

Les mesures de la photosynthèse nette et des échanges gazeux ont été effectuées à l'aide d'un appareil portable Li-Cor modèle 6400 (Lincoln, NE, USA). Les paramètres mesurés et calculés sont :

- La photosynthèse nette (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ;
- La concentration intercellulaire en CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol air}^{-1}$) ;
- La conductance stomatique (g_s , $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ;
- La transpiration (T_r , $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Pour chacun de ces paramètres, les mesures ont été réalisées sur 8 individus avec 2 analyses par plantes pour chaque condition de culture sur sol. Lors des expérimentations en hydroponie, les mesures ont été effectuées sur 5 individus avec 2 analyses par plantes. Les 2 mesures réalisées sur chaque plante ont permis d'obtenir une valeur moyenne pour chaque individu.

3.2. Principe

Les mesures des échanges gazeux ont été réalisées sur des plantes cultivées sur sol ou en hydroponie totale à la suite d'un stress As.

La feuille est enfermée dans une chambre étanche de 6 cm² dans laquelle sont relevés régulièrement plusieurs paramètres (température de l'air, humidité relative, éclairage). Une pompe assure la circulation de l'air dans le système et l'amène vers le spectrophotomètre infrarouge (IRGA : Analyseur de Gaz à Infra Rouge). Le CO_2 est dosé par mesure différentielle entre la cellule de mesure et une cellule de référence où circule un air dépourvu

en CO₂ (par passage sur du bicarbonate de calcium). La concentration en CO₂ du mélange gazeux pénétrant dans la chambre de mesure est ajustée à la valeur souhaitée par un injecteur à CO₂ (LI-6400-01, Lincoln, NE, USA) qui utilise comme source des cartouches sous haute pression de CO₂ liquéfié. Les mesures ont été réalisées en utilisant une concentration de 360 µmol CO₂.mol air⁻¹. L'humidité relative a été maintenue à 60 ± 5 % par passage sur du sulfate de calcium anhydre. La température des feuilles, maintenues à 23 °C, est mesurée par un thermocouple et la température de la chambre contrôlée par deux refroidisseurs thermoélectriques à effet Peltier. L'intensité lumineuse a été mesurée au niveau de l'échantillon par un détecteur de lumière à diode de silicone. Au cours de l'expérimentation, l'éclairement de la feuille était de 400 µmol.m⁻².s⁻¹, il était assuré par le module LI- 6400-02 LED (Light Emitting Diode, Lincoln, NE, USA).

Au cours d'une mesure, l'analyseur enregistre régulièrement le flux de la pompe et les variations des taux de CO₂ et d'H₂O sont calculées selon les équations de Von Caemmerer et Farquhar (1981). Les mesures sont réalisées en continu.

3.3. Protocole de saturation lumineuse et en CO₂ de la photosynthèse

Les mesures ont été réalisées sur deux espèces végétales, *V. faba* et *S. nigrum*, cultivées en hydroponie à la suite d'un traitement à l'As d'une durée de 14 jours. 5 répétitions par conditions de culture et par espèces végétales ont été réalisées.

Saturation lumineuse

La feuille utilisée pour cette mesure est progressivement adaptée à une intensité lumineuse de 2 000 µmol.m⁻².s⁻¹. Puis 10 niveaux d'éclairements d'intensité décroissante sont appliqués (2 000 - 1 500 - 1 000 - 800 - 600 - 400 - 300 - 200 - 100 - 0 µmol.m⁻².s⁻¹). Pour chaque intensité lumineuse, les mesures sont relevées après une durée de stabilisation de plusieurs minutes (maximum 5 min). Les mesures ont été réalisées à la concentration de 360 µmol CO₂.mol air⁻¹ et à une humidité relative de 60 ± 5 %.

Variation de la teneur en CO₂

Six niveaux de concentrations en CO₂ ont été testés (1 500 - 1 200 - 900 - 600 - 300 - 0 µmol CO₂.mol air⁻¹), réalisés par le passage de l'air sur un absorbeur de CO₂ ou par enrichissement de l'air avec du CO₂ exogène. Les mesures ont été faites sous un éclairage de 400 µmol.m⁻².s⁻¹ assuré par le module LI- 6400-02 et à une humidité relative de 60 ± 5 %.

4. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

La mesure de la fluorescence des chlorophylles *a* permet de quantifier les activités des systèmes photosynthétiques, traduisant l'état physiologique de la partie aérienne de la plante.

4.1. Modélisation de la fluorescence de la chlorophylle *a*

Le rendement de fluorescence (Φ_F) peut être défini par le rapport entre l'intensité de la fluorescence (F) et l'intensité du flux de photons absorbé (J) (Maxwell et Johnson, 2000) :

$$\Phi_F = \frac{F}{J}$$

L'intensité de fluorescence émise dépend du taux de fluorescence (K_F), considéré comme invariable, tandis que le flux de photons absorbé est réparti selon les différentes voies de désexcitation possibles. Outre la fluorescence, les autres voies non photochimiques de désexcitation de la chlorophylle *a* sont la dissipation non-radiative (dissipation thermique) et les transferts vers d'autres photosystèmes. Ces voies de désexcitation peuvent s'écrire sous la forme de trois constantes de vitesse :

- K_P pour la voie photochimique ;
- K_D pour la dissipation thermique ;
- K_T pour le transfert de l'énergie d'excitation directement vers les PSI.

Le transfert photochimique dépend de l'état du centre réactionnel. Si l'accepteur primaire (quinone A) est à l'état réduit (Q_A^-), il ne peut pas y avoir séparation de charge. Le centre est dit fermé et K_P est nul. Dans le cas contraire, le centre est dit ouvert. Il en résulte l'équation :

$$F = J \times \frac{K_F}{(K_F + K_D + K_T + K_P)} \quad \text{pour un centre ouvert}$$

$$F = J \times \frac{K_F}{(K_F + K_D + K_T)} \quad \text{pour un centre fermé}$$

Le rapport $K_F/\Sigma K_i$ représente la probabilité que l'énergie reçue d'un photon par le PSII soit dissipée par fluorescence. Mesurée au niveau de la feuille, l'intensité de fluorescence sera donc dépendante de :

- J, la densité de photons reçue par les photosystèmes II ;
- La valeur des différentes constantes de vitesse des processus impliqués dans la désexcitation de la chlorophylle ;
- La fraction B de centres ouverts.

Dans l'hypothèse où il n'y a pas de migration entre les PSII, l'émission de fluorescence peut alors s'exprimer selon l'équation :

$$F = J \times \left[B \times \frac{K_F}{(K_F + K_D + K_T)} + (1-B) \times \frac{K_F}{(K_F + K_D + K_T)} \right]$$

4.2. Cinétique de Kautsky

Lorsque des plantes adaptées à l'obscurité sont brusquement soumises à un éclairage donné constant, l'émission de fluorescence suit une cinétique caractéristique liée à l'activation des mécanismes photosynthétiques. Cette cinétique, décrite par Kautsky et son équipe (1960), se décompose en deux parties. Initialement, la feuille était adaptée à l'obscurité, tous les PSII sont synchronisés à l'état ouvert ($B = 1$) et la fluorescence F est à son niveau minimal noté F_0 . L'augmentation rapide de la fluorescence jusqu'à la valeur F_p observée au cours de cette phase (0,5 à 2 secondes) est attribuée à la fermeture des PSII. Cette phase rapide est suivie par une phase de décroissance plus lente. L'activation de la chaîne de transfert des électrons entraîne la réouverture des photosystèmes. Le transfert photochimique et la mise en place de différentes voies de transfert non-photochimique entrent en compétition avec l'émission de fluorescence et participent à son extinction progressive. Une valeur stable, notée F_s , est atteinte en quelques minutes. Cette émission de fluorescence caractérise un état d'équilibre entre les voies de transfert photochimique et non-photochimique de l'énergie.

4.3. Méthode des flashes saturants

A partir de la cinétique de Kautsky, Schreiber et son équipe (1986) ont décrit une méthode qui permet de quantifier l'activité des PSII (Figure II.6).

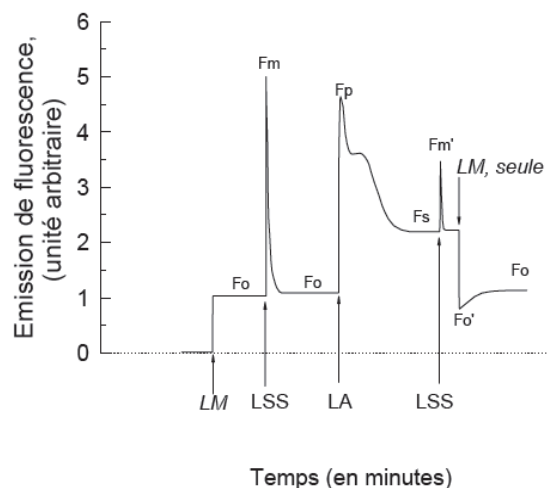


Figure II.6 : Variation de la fluorescence modulée en fonction du temps sur une feuille intacte.

LM : lumière modulée de très faible intensité (lumière analytique)

LSS : flash de lumière sursaturante

LA : lumière actinique

Lorsqu'une plante maintenue à l'obscurité est soumise à une lumière modulée de très faible intensité (lumière analytique, LM), le transfert d'électrons photochimiques ne se produit pas. La fluorescence est à son niveau minimal F_0 . Le niveau de fluorescence maximal F_m peut alors être mesuré si un flash de lumière sursaturante d'une durée d'environ 1 s (LSS) est imposé à la feuille. L'intensité de ce flash de lumière doit être saturante pour conduire à la fermeture de tous les PSII et suffisamment brève pour ne pas induire la mise en route de la chaîne de transfert des électrons. Réalisée sur les PSII synchronisés à l'état ouvert, cette mesure est une estimation de l'efficacité maximale du transfert des électrons ou efficacité photochimique maximale des PSII (Krause, 1988) :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} = J \times \frac{K_F}{(K_F + K_D + K_T + K_P)}$$

L'efficacité photochimique potentielle des PSII (F_v/F_m) est un paramètre remarquablement indépendant du modèle étudié.

Une lumière actinique (LA), d'une intensité donnée, est ensuite appliquée pour induire une courbe de Kautsky. Lorsque l'état stationnaire est atteint, l'application d'un flash sursaturant (LSS) permet la mesure d'un pic F_m' correspondant à la fermeture de tous les PSII.

Par analogie à la définition de l'efficacité photochimique des PSII pour une feuille adaptée à l'obscurité, l'efficacité photochimique effective des PSII sous un éclairage donné est représentée par Φ_{PSII} (efficacité photochimique des PSII ouverts). Le rendement quantique du transport non cyclique des électrons sous un éclairage donné dépendra donc à la fois de l'efficacité photochimique des PSII ouverts, et de la fraction de PSII ouverts (B). Il peut donc s'exprimer selon l'équation :

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'}$$

Lors de l'extinction de la lumière actinique, l'application d'une lumière infrarouge, absorbée spécifiquement par les PSI, permet la réoxydation rapide de toutes les Q_A , c'est à dire la réouverture des PSII. Le niveau minimal de fluorescence F_0' est alors mesuré.

La corrélation linéaire entre Φ_{PSII} et le rendement quantique de l'assimilation de CO_2 en l'absence de photorespiration a été mise en évidence par Genty et son équipe (1989). Öquist et Chow (1992) ont montré que cette linéarité n'est pas universelle. Certaines réactions alimentées par la chaîne de transfert des électrons (réaction de Mehler, par exemple) pourraient limiter cette linéarité. Cependant la faible proportion quantitative de ces réactions ne semble pas mettre en cause la mesure des flux photosynthétiques d'oxygénation et de carboxylation par ces techniques (Osmond et Grace, 1995).

4.4. Mesures des paramètres de la fluorescence de la chlorophylle a

Les mesures de fluorescence des chlorophylles ont été réalisées à l'aide d'un système P.A.M. F.M.S. 1 ("Pulse Amplitude Modulation Fluorescence Monitoring System 1", Hansatech Instrument Ltd., Norfolk, UK). Un ensemble de fibres optiques permet d'additionner sur un même échantillon des éclairages provenant de plusieurs sources. Le système de mesure repose sur l'utilisation d'une lumière continue de très faible intensité, lumière actinique, et d'une lumière modulée, flash de lumière sursaturante. Un dispositif de filtres permet de limiter l'amplification et l'enregistrement de la lumière uniquement à celle qui est modulée.

Toutes les mesures ont été effectuées sur la face supérieure dans la partie centrale des feuilles. La fluorescence initiale (F_0) et la fluorescence maximale (F_m) ont été mesurées après adaptation des plantes à l'obscurité (1 heure). La fluorescence maximale (F_m) a été obtenue

grâce à un flash sursaturant de 1 s de $13\,000\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La mesure de l'efficacité photochimique effective (ΦPSII) a été obtenue par la méthode des flashes sursaturants sous une lumière actinique de $350\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (intensité lumineuse en conditions de culture).

Pour chacun de ces paramètres, les mesures ont été réalisées sur 8 individus avec 2 analyses par plantes pour chaque condition de culture sur sol. Lors des expérimentations en hydroponie, les mesures ont été effectuées sur 5 individus avec 2 analyses par plantes. Les 2 mesures réalisées sur chaque plante ont permis d'obtenir une valeur moyenne pour chaque individu.

5. Mesure de la composition en acide gras des feuilles et produits de dégradation

5.1. Analyse de la composition en acide gras de feuilles

La composition en acides gras des feuilles a été déterminée sur les plus jeunes feuilles des plants de *S. nigrum* et *V. faba* cultivées en hydroponie selon le protocole de Le Guédard *et al.* (2008). En effet, les feuilles âgées, habituellement utilisées pour ce type d'analyse, se sont révélées, dans certaines conditions de culture, jaunies voire desséchées. Par la suite, les tissus foliaires prélevés sont placés dans 1 mL de méthanol contenant 2,5 % d'acide sulfurique. L'échantillon est chauffé 1 h à 80 °C. Ensuite, les tubes sont refroidis rapidement dans la glace et, après ajout de 0,75 mL d'hexane et 1,5 mL d'eau, ils sont agités et centrifugés. La phase hexane (phase supérieure) est alors prélevée, et les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Hewlett Packard 5890 série II) sur une colonne capillaire Carbowax 1,2 micron, 15 m (Altech, Deerfield, IL., USA). Le volume injecté est de 1 μL . La température est programmée à partir du protocole suivant : la température initiale est de 160 °C maintenue 1 min après l'injection, puis augmentation de la température de 20 °C/min jusqu'à 190 °C, puis de 5 °C/min jusqu'à 210 °C. Cette température est ensuite maintenue pendant 5 min.

Ces analyses ont été réalisées par le Laboratoire de Biogenèse Membranaire de l'Université de Bordeaux II. Lors des expérimentations en hydroponie, 5 répétitions par condition de culture ont été effectuées.

Ce procédé a été normalisé et enregistré par l'AFNOR (Le Guédard et Bessoule, AFNOR X31-233: Qualité du sol - Analyses des acides gras des végétaux comme biomarqueurs de la pollution des sols, *in press*).

5.2. Mesure de la peroxydation des lipides membranaires

La mesure de la peroxydation des lipides membranaires, selon le protocole élaboré par Ben Youssef *et al.* (2005), est réalisée sur les feuilles de plantes cultivées en hydroponie et sur les feuilles des plantes cultivées sur sol.

Les extraits végétaux sont préparés à partir de matériel végétal frais broyé en présence d'azote liquide dans un mortier préalablement congelé. Après décongélation, 2 g de tissus végétaux broyés sont mis en contact avec 20 mL de tampon formé d'acide thiobarbiturique à 0,5 % (TBA) et d'acide trichloroacétique à 20 % (TCA). Le mélange est homogénéisé et incubé à 90 °C pendant 30 min. Au cours de l'incubation, un complexe se forme entre le TBA et les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) dont le MDA. La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans un bain de glace. Après centrifugation à 10 000 g pendant 20 min et à 4 °C, le surnageant est récupéré et filtré sur filtre seringue de 0,45 µm de diamètre de pores (Sartorius, Minisart stérile), pour un dosage colorimétrique des lipoperoxydes.

Le dosage est effectué par spectrophotométrie (Spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 2S UV-VIS), l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 532 nm. La densité optique est corrigée par une lecture à 600 nm. Un blanc est réalisé avec du tampon d'extraction.

La concentration de TBARS est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$$\text{TBARS (nmol/g MF)} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times V}{155 \times \text{MF}} \times 1000$$

A = Absorbance

V = Volume de l'extrait (mL)

MF = Matière végétale fraîche (g)

Lors des expérimentations en hydroponie, 5 répétitions par condition de culture ont été effectuées.

Chapitre VI : Développement d'un procédé de phytostabilisation in-situ

1. Principes et élaboration du procédé

L'expérimentation d'un procédé de phytostabilisation *in-situ* sur la friche industrielle de la Vieille Usine d'Auzon a été menée au cours de l'année 2010. Elle a été réalisée sur 3 rangées de 8 parcelles de 10 m² mises en place sur le site industriel (24 parcelles), celles-ci permettent d'établir 8 conditions de culture répliquées chacune 3 fois (Figure II.7). Pour chaque couvert végétal testé sur sol pollué, une parcelle contrôle est installée sur le site témoin (3 parcelles). Chaque parcelle est délimitée et séparée les unes des autres par une bande enherbée de 50 cm. La mise en culture a été faite sur deux jours, le 26 et 27 mai 2010, la récolte a été effectuée dans la semaine du 6 septembre 2010.

Un apport abondant en eau a été effectué lors des semis. Par la suite, l'apport en eau s'est fait naturellement ou par arrosage manuel quand les conditions climatiques l'exigeaient. Le suivi des conditions climatiques a été réalisé grâce à des bulletins d'irrigations obtenus auprès de Météo France. Ces bulletins renseignent sur la température journalière (minimale, maximale et moyenne), l'évapotranspiration potentielle et la pluviométrie. Ces mesures ont été effectuées à partir de la station Fontannes située à 15 km du site et à une altitude similaire à Auzon.

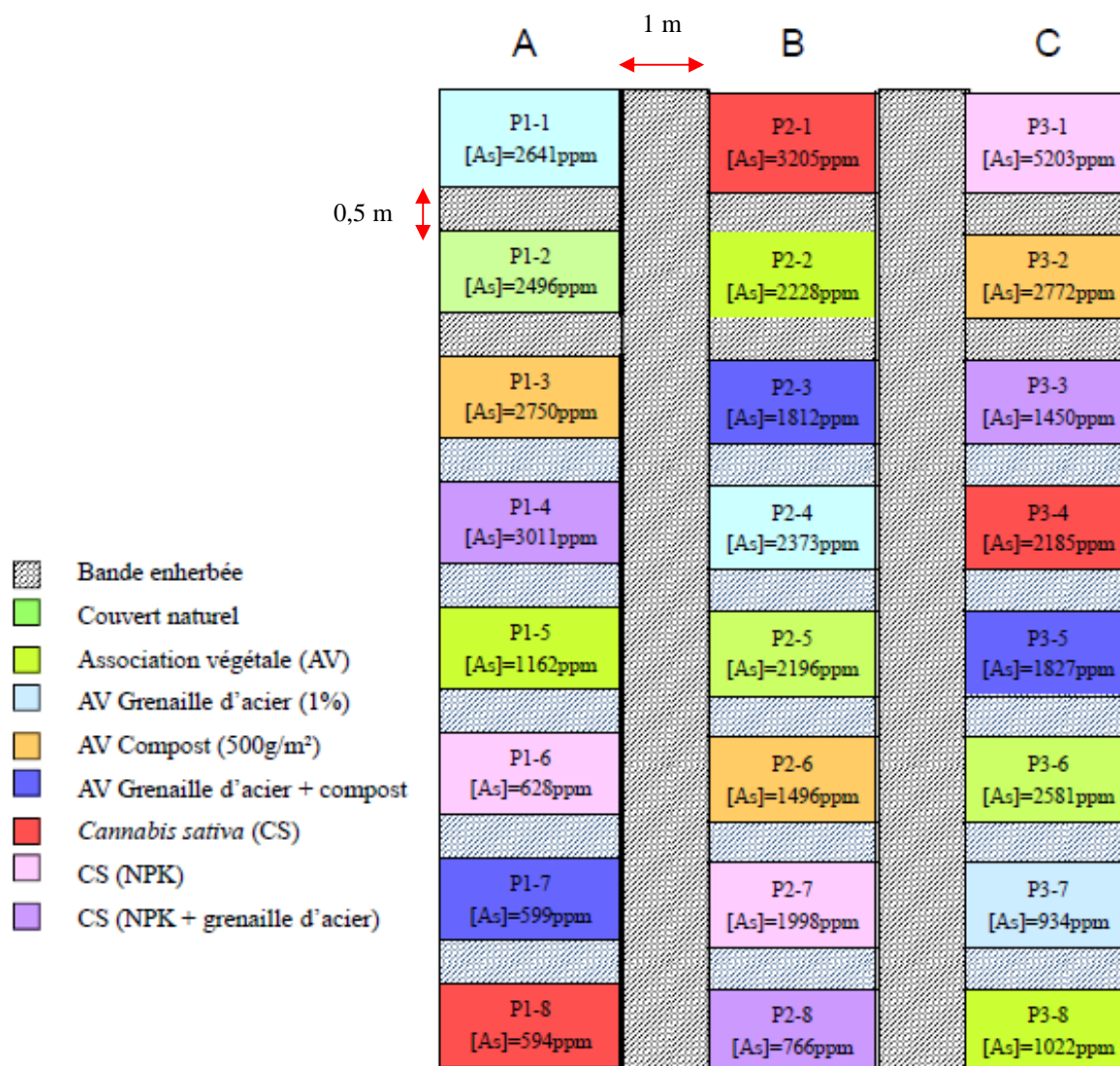


Figure II.7 : Disposition des parcelles, AV = Association Végétale, CS = *Cannabis sativa*.

2. Préparation du sol et amendements

Une fois les parcelles délimitées, elles ont été complètement désherbées manuellement puis labourées deux fois au motoculteur sur une profondeur de 10 à 15 cm avant et à la sortie de l'hiver 2010 (Figure II.8). Au cours de l'hiver 2010, une bâche a été installée sur le site pour éviter la recolonisation du milieu par la végétation (de novembre à fin mars 2010).



Figure II.8 : Préparation des parcelles au printemps 2010 avant la mise en culture (Austruy, 2010).

Pour faciliter le développement de la végétation, l'immobilisation des polluants par des amendements adaptés a été privilégiée. Le choix des amendements s'est basé sur les différents travaux réalisés en phytostabilisation (Mench *et al.*, 2010 ; Kumpiene *et al.*, 2012). D'une part, le choix s'est porté sur la grenaille de fer, permettant la formation d'oxy/hydroxydes de fer considérés comme des sites de fixation privilégiés des ions métalliques. D'autre part, l'apport de matière organique et d'engrais NPK a été effectué dans le but d'enrichir le sol et de faciliter l'implantation du couvert végétal. Ainsi, selon le couvert végétal, trois types d'apports ont été effectués :

- Un apport de grenaille d'acier zérovalent type GH120 à 1 % testé sur les deux types de culture soit 15,5 kg par parcelle apportés en deux fois ;
- Un apport de matière organique sous forme de lombricompost pour la culture de plantes prairiales, 500 g.m⁻² soit 5 kg par parcelle ;
- Un apport d'engrais NPK (5 - 10 - 20 %) pour la monoculture de chanvre, soit 100 g d'azote par parcelle, 200 g de phosphore par parcelle et 400 g de potassium par parcelle.

Pour évaluer l'interaction entre les amendements, la matière organique pour la culture prairiale et l'engrais pour la culture de chanvre ont été mélangés à de la grenaille d'acier GH120. Au total, pour chaque type de culture 5 conditions ont été testées, en incluant la condition contrôle sur sol témoin et la culture sur parcelle polluée sans amendement.

Les apports de grenaille d'acier et de matière organique ont été réalisés lors du 2^{ème} passage du motoculteur permettant d'homogénéiser le sol avec l'amendement.

3. Couvert végétal et sélection des espèces

Deux couverts végétaux, dont leur comportement et leur tolérance aux éléments traces avaient été testés en condition contrôlée en laboratoire, ont été mis en place sur le site d'étude. Par ailleurs, la végétation naturelle présente sur le site a été maintenue sur trois parcelles contaminées ainsi que sur une parcelle témoin, pour évaluer le bénéfice des plantes sélectionnées sur les teneurs et la toxicité en éléments traces présent dans le sol.

3.1. Association de plantes prairiales

L'association végétale est composée de plantes prairiales herbacées sélectionnées en fonction de plusieurs critères :

- Espèces métallophytes reconnues dans la bibliographie ;
- Inventaire des espèces présentes naturellement sur le site d'étude ;
- Mélange de groupe d'espèce en fonction de leurs caractéristiques, notamment pour la sélection de graminées qui permettent un bon recouvrement du sol et possèdent un système racinaire dense, et pour la présence de légumineuse qui permettent une fixation de l'azote atmosphérique ;
- Revalorisation paysagère du site.

Le Tableau II.8 répertorie les espèces sélectionnées et leur abondance dans l'association végétale. Les graines ont toutes été fournies par la société Nungesser Semences de Strasbourg. La densité végétale est de 30 g/m² de graines semées à la volée, celles-ci sont recouvertes de 1 à 2 cm de terre par le passage d'un râteau.

Tableau II.8 : Présentation des espèces sélectionnées pour l'étude par famille avec leur proportion dans l'association végétale.

Graminée 50%	Légumineuse 30%	Autres 20%
<i>Agrostis capillaris</i> 20%	<i>Onobrychis viciifolia</i> 10%	<i>Achillea millefolium</i> 5%
<i>Arrhenaterum elatius</i> 10%	<i>Medicago lupulina</i> 10%	<i>Euphorbia cyparissias</i> 5%
<i>Dactylis glomerata</i> 10%	<i>Lotus corniculatus</i> 5%	<i>Plantago lanceolata</i> 5%
<i>Holcus lanatus</i> 10%	<i>Vicia faba</i> 5%	<i>Silene latifolia</i> 5%

Ce couvert a pour but de revaloriser ce site contaminé d'un point de vue environnemental et paysager. En effet, l'apport d'un couvert dense et varié a pour objectif de diminuer le transfert des polluants dans les milieux voisins et permettre sa détoxification au niveau rhizosphérique. De plus, la revégétalisation de ce site avec des plantes prairiales permet de le réintégrer d'un point de vue paysager.

3.2. Monoculture de chanvre

Le chanvre est semé à une densité de 5 g.m², les graines sont placées en ligne à 5 cm de profondeur, 5 rangées par parcelle ont été mises en place.

4. Paramètres suivis

Au cours de la culture, différents paramètres sont suivis pour évaluer d'une part l'évolution des paramètres physiologiques des plantes mises en culture et d'autre part les variations des teneurs et de la spéciation des éléments traces dans le sol.

Au niveau de la végétation, les mesures se sont portées sur :

- L'étude de la diversité de l'association prairiales par parcelle ;
- Les coefficients d'abondance / dominance des espèces et des taxons par parcelle ;
- Mesure de la biomasse végétale et de la croissance des plantes ;
- Dosage As, Pb, Cd, Sb, Cu, Fe et P dans les parties racinaires et aériennes.

Dans le sol, notre attention c'est portée sur le contenu et le comportement des métaux dans le sol ainsi que sur le suivi des paramètres physico-chimiques en fonction des différentes conditions de culture :

- Mesure des teneurs totales et disponibles en As, Pb, Cd, Sb, Cu, Fe, P ;
- Evolution des paramètres physico-chimiques, pH, CEC, matière organique et C/N.

3 échantillons par parcelle ont été effectués. Pour se faire, 3 surfaces de 1 m² ont été définies aléatoirement sur chaque parcelle et ont permis de réaliser l'échantillonnage pour les différentes analyses décrites précédemment. Les échantillons de plantes récoltées représentent un pool des espèces composant le couvert végétal étudié.

Chapitre VII : Analyses statistiques des données

Toutes les analyses statistiques présentées dans ce travail ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT 2010.

1. Test U de Mann et Whitney

Les moyennes des échantillons ne vérifiant pas la condition de normalité ont été comparées deux à deux à l'aide du test U de Mann et Whitney. Ce test concerne essentiellement les analyses effectuées sur les échantillons de sols et de végétaux lors des cultures *in-situ*. Le risque d'erreur a été fixé à 5 %.

2. Analyse de Variance (ANOVA)

Lorsque l'ensemble des échantillons étudiés présentent des distributions indépendantes respectant la normalité et de variances identiques, l'ANOVA a été appliquée pour déterminer d'éventuelles différences entre les moyennes de ces échantillons. Ce test a donc été utilisé principalement pour mettre en évidence l'effet de la concentration et de la forme de l'As dans la réponse des plantes au stress As lors des expérimentations sur sol et en hydroponie réalisées au laboratoire. Le risque d'erreur a été fixé à 5 %.

3. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Lors de l'expérimentation *in-situ* de phytostabilisation, des ACP ont été réalisées sur un certain nombre de paramètres. Cette analyse factorielle permet une étude globale incluant toutes les caractéristiques des données, est une aide à la compréhension des interactions entre les différents paramètres et évalue d'éventuelle similitude entre les différents points d'échantillonnage (Thioulouse *et al.*, 1991).

Troisième partie :
Résultats - Discussion

Chapitre I : Description des sols d'études

1. Caractérisation des paramètres physico-chimiques des sols échantillonnés

Différentes analyses physico-chimiques ont été réalisées afin de mettre en évidence les principales caractéristiques des différents sols utilisés dans cette étude (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Paramètres physico-chimiques des différents types de sols étudiés (n = 4).

Paramètres	Unités	Terreau	Auzon Témoin (AT)	Auzon Pollué (AP)
pH _{eau}	-	6,20 ± 0,02	6,70 ± 0,19	5,99 ± 0,08
pH _{KCl}	-	-	5,70 ± 0,04	4,76 ± 0,01
CEC	cmol ⁺ .kg ⁻¹	110,0 ± 0,1	13,8 ± 0,1	10,1 ± 0,3
Phosphore soluble		1,2 ± 0,3	0,032 ± 0,005	0,081 ± 0,002
Azote total	g.kg ⁻¹	16,5 ± 0,9	2,7 ± 0,1	4,1 ± 0,3
Matière organique		629,0 ± 12,8	42,5 ± 2,5	56,8 ± 2,3
C/N	-	22,0 ± 2,2	9,2 ± 0,5	8,2 ± 0,2

Les sols AT et AP sont caractérisés par un pH faiblement acide, respectivement 6,7 et 6,0. Le contenu en matière organique totale est relativement élevé (42,5 et 56,8 g.kg⁻¹ respectivement pour le sol AT et AP) alors que la teneur en azote total est relativement faible (2,7 et 4,1 g.kg⁻¹, respectivement pour les sols AT et AP) (Delaunois *et al.*, 2008). Il en résulte un rapport C/N optimal dans ces sols (8 à 9,5 respectivement pour les sols AT et AP). La CEC varie de 10 à 13,5 cmol⁺.kg⁻¹. La teneur en phosphore soluble est deux fois plus élevée dans le sol pollué que dans le sol témoin (80 contre 30 mg.kg⁻¹ respectivement), il en résulte un sol pollué bien pourvu en phosphore soluble au contraire du sol AT qui présente une teneur relativement faible (Delaunois *et al.*, 2008). Ainsi, le phosphore ne sera pas un facteur limitant pour le développement de la végétation sur le sol pollué (AP). Un apport d'engrais

phosphaté n'est donc pas nécessaire. Par ailleurs, le terreau est riche en azote et en matière organique, des paramètres qui lui confèrent une fertilité et des qualités agronomiques élevées.

La texture des sols AT et AP a été déterminée à partir du triangle des textures (Figure III.1) grâce à la répartition granulométrique des particules du sol. Pour les deux sols d'Auzon (AT et AP), il s'agit d'une texture limoneuse sableuse (Figure III.1).

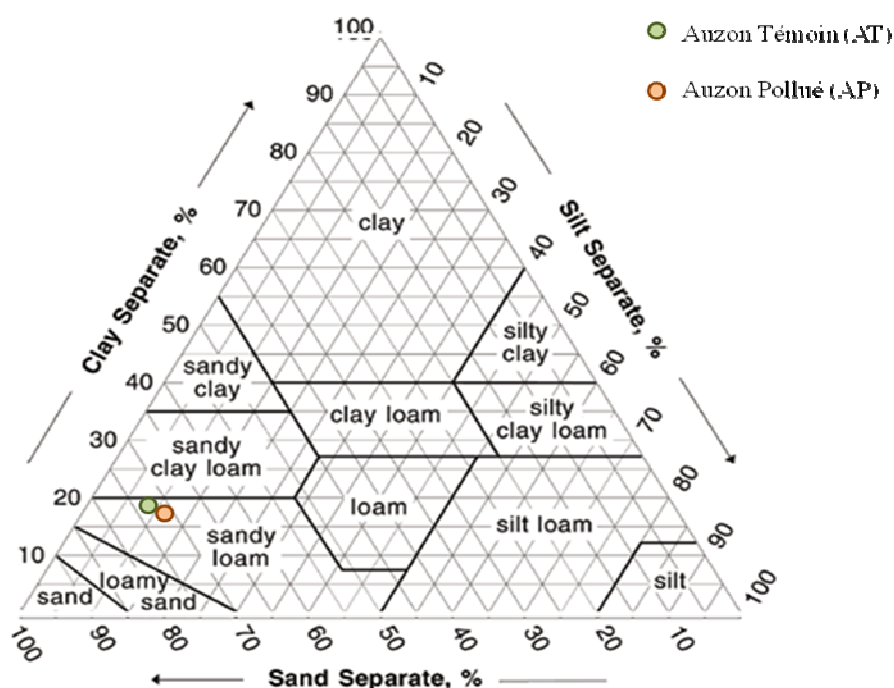


Figure III.1 : Positionnement des sols AT et AP dans le triangle des textures (USDA).

A partir de la répartition granulométrique des particules de sol, les propriétés hydriques des sols AT et AP ont été déterminées et sont présentées dans le Tableau III.2. Ces données permettent d'évaluer l'état hydrique du sol *in situ*. Le point de flétrissement et la capacité au champ sont respectivement les bornes inférieures et supérieures de la Réserve en eau Utile du solum (RU). L'évaluation de la RU a pour principale application l'évaluation de l'alimentation hydrique des plantes. L'étude de ces paramètres met en évidence des propriétés hydriques communes entre les deux sols AT et AP.

Tableau III.2 : Répartition granulométrique et état hydrique des sols AT et AP.

		Auzon Témoin (AT)	Auzon Pollué (AP)
Sable	%	72,43	72,51
Argile		9,25	10,25
Limons		18,32	17,24
Texture		Limoneux sableuse	Limoneux sableuse
Densité apparente	g.cm ⁻²	1,58	1,57
Conductivité hydraulique	cm.h ⁻¹	3,09	2,65
Capacité au champ	cm ² eau.cm ⁻² sol	0,18	0,18
Point de flétrissement		0,08	0,09
Réserve en eau utile (RU)		0,1	0,09

2. Evaluation de la pollution du sol aux ETM et métalloïdes

Les teneurs totales de certains ETM ont été analysées dans les différents types de sols afin d'évaluer les éléments traces en excès et potentiellement polluants. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.3.

Dans un premier temps, l'analyse des ETM met en évidence une forte hétérogénéité dans leur distribution au niveau de l'horizon de surface du sol AP. Celle-ci reflète une contamination localisée suite au dépôt et au stockage de substances polluantes. Par ailleurs, le sol AP est caractérisé par une forte teneur en As (3 163,8 mg.kg⁻¹). Celle-ci est 85 fois plus élevée que la valeur seuil (VCI) définie par le BRGM (2002). Les concentrations en Pb, Sb et Cu dans le sol AP (respectivement 910, 797 et 248 mg.kg⁻¹) dépassent également les VCI définies pour les zones sensibles. Cependant, les teneurs en Pb, Cu et Sb sont modérées par rapport à celle de l'As. Dans le sol témoin (AT), les ETM étudiés sont peu concentrés à l'exception de l'As qui présente des teneurs supérieures à la valeur seuil (VCI zone sensible). Cependant, les concentrations de Zn, Pb, Co, Cu, Cd et As mesurées dans l'horizon supérieur du sol AT sont supérieures aux valeurs ASPITET, représentant une gamme des teneurs naturelles des différents ETM mesurées dans les sols agricoles français. Le terreau ne présente aucune contamination.

Tableau III.3 : Teneurs totales en ETM dans l'horizon supérieur des différents sols à l'étude, le terreau, les sols AT et AP (n = 4) et Valeur de Constat d'Impact zone sensible (VCI).

Eléments	Unités	Terreau	Auzon Témoin (AT)	Auzon Pollué (AP)	VCI ¹	Valeurs ASPITET ²
Mn	g.kg ⁻¹	0,1 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,1	-	-
Zn		50,1 ± 3,2	144,9 ± 3,8	165,3 ± 11,0	9000	10-100
Pb		5,7 ± 5,1	98,3 ± 4,8	910,1 ± 518,7	400	9-50
Co		nd	92,5 ± 4,5	83,7 ± 6,2	240	2-23
Ni		4,5 ± 0,3	32,9 ± 2,5	28,9 ± 2,2	140	2-60
Cr	mg.kg ⁻¹	9,8 ± 0,7	64,5 ± 2,2	51,1 ± 1,1	130	10-90
Cu		17,1 ± 0,3	26,2 ± 0,4	248,0 ± 26,0	190	2-20
Cd		nd	0,5 ± 0,1	4,8 ± 2,5	20	0,05-0,45
As		2,2 ± 0,0	233,8 ± 45,7	3163,8 ± 800,7	37	1-25
Sb		nd	6,8 ± 1,0	797,2 ± 582,2	100	-

¹VCI: Valeurs indicatives pour la pollution des sols dans les zones sensibles (BRGM, 2002)

²Valeurs du réseau national d'études des sols agricoles ASPITET relevées sur plus de 1800 sols, INRA (1993-2005)

nd : non détecté

Pour déterminer l'origine des ETM retrouvés en excès dans l'horizon de surface, des Facteurs d'Enrichissement (FE) ont été calculés pour tous les éléments en excès à différentes profondeurs (horizon de surface, -30 et -50 cm) et en se basant sur un élément de référence, l'aluminium (Al). Le choix de cet élément repose sur plusieurs critères (Sterckeman *et al.*, 2007) :

- Il est géochimiquement stable ;
- Il est abondant et ses teneurs sont peu modifiées par les activités anthropiques ;
- Le rapport entre cet élément et les autres éléments traces dans la croûte terrestre est relativement constant ;
- Il peut être minéralisé et dosé de la même manière que les éléments étudiés dans ce travail.

Le calcul du facteur d'enrichissement est le suivant :

$$FE = \frac{[ETM] / [Al] \text{ (horizon supérieur)}}{[ETM] / [Al] \text{ (horizon profond)}}$$

Les résultats, présentés dans la Figure III.2, montrent une diminution significative des FE avec la profondeur pour l'ensemble des éléments traces en excès, reflétant une origine anthropique de ces éléments dans l'horizon de surface. Par ailleurs, l'étude des profils des FE avec la profondeur met en évidence une accumulation de ces ETM à environ 30 cm de profondeur. Cette couche de couleur noire et d'origine anthropique pourrait indiquer que les horizons de surfaces ont été remaniés (Cancès, 2004). En effet, la parcelle 227 servait essentiellement de lieu de stockage, entraînant une accumulation des ETM en surface, un remaniement du sol a pu entraîner une accumulation de ces éléments à 30 cm de profondeur.

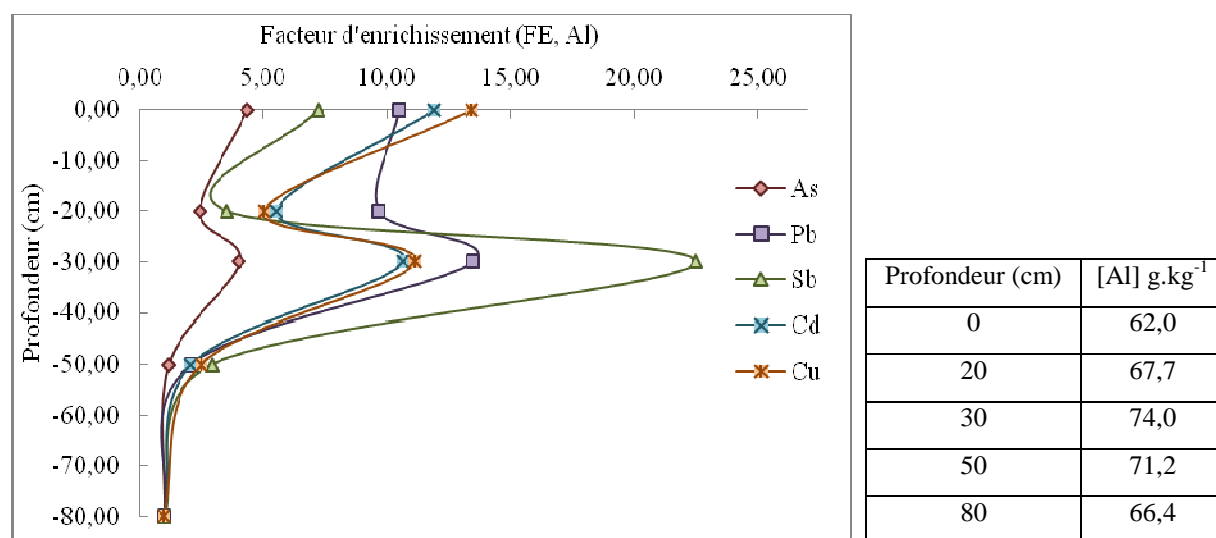


Figure III.2 : Evolution, en fonction de la profondeur, des facteurs d'enrichissement de l'As, du Cu, du Pb, du Cd et de l'Sb sur le site de la Vieille Usine d'Auzon (AP), calculés en utilisant Al comme élément de référence, le tableau ci-contre présente les teneurs en Al (g.kg⁻¹) au différentes profondeurs.

L'As a été identifié comme le polluant le plus présent sur le site industriel de la Vieille Usine d'Auzon (Laperche et Eisenlohr, 2001 ; Matera, 2001 ; Cancès, 2004). Par ailleurs, il présente, de par sa grande mobilité dans le sol AP, un risque de toxicité élevée. Pour la suite de cette étude, les expérimentations porteront principalement sur la contamination à l'As, tant au niveau du sol avec l'étude du profil de l'As, de sa spéciation chimique et de sa disponibilité, qu'au niveau des plantes en évaluant, d'une part, les impacts physiologiques et biochimiques de la pollution des sols et, d'autre part, l'accumulation de l'As dans les plantes.

3. Répartition et phases porteuses de l'As dans le sol

Le sol AT, utilisé comme sol témoin, présente une teneur en As supérieure aux teneurs moyennes couramment observées dans le sol français (Tableau III.3) comprises entre 1 et 25 mg.kg^{-1} (Baize, 2010). Or, d'après la Figure III.3, les concentrations en As relevées dans le sol AT ne varient pas avec la profondeur. Les teneurs mesurées dans l'horizon de surface ont donc une origine naturelle. Au contraire, les teneurs en As observées dans le sol AP diminuent avec la profondeur. Dans l'horizon de surface, la teneur en As s'élève en moyenne à 3163,8 mg.kg^{-1} , elle est d'environ 400 mg.kg^{-1} à 80 cm de profondeur.

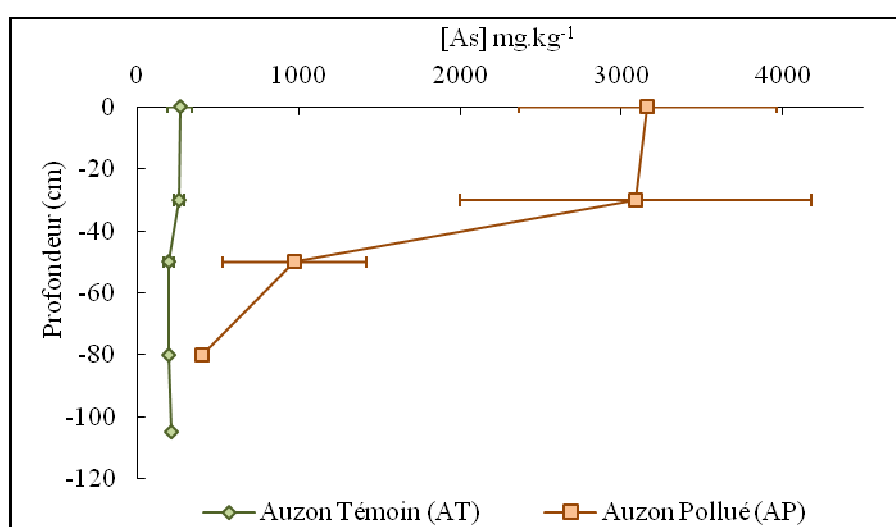


Figure III.3 : Teneurs en As dans différents horizons de sol d'Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP) (n = 4).

L'évolution des teneurs en As avec la profondeur met en évidence une origine anthropique de la pollution. Les variations importantes des concentrations en As relevées dans l'horizon de surface du sol AP mettent là encore en évidence l'hétérogénéité de la pollution.

L'extraction séquentielle de l'As dans les échantillons de sol permet de déterminer les différentes formes considérées comme mobiles et pouvant facilement participer au cycle biogéochimique de l'As. Les résultats mettent en avant une répartition de l'As différente entre les deux types de sols (Figure III.4).

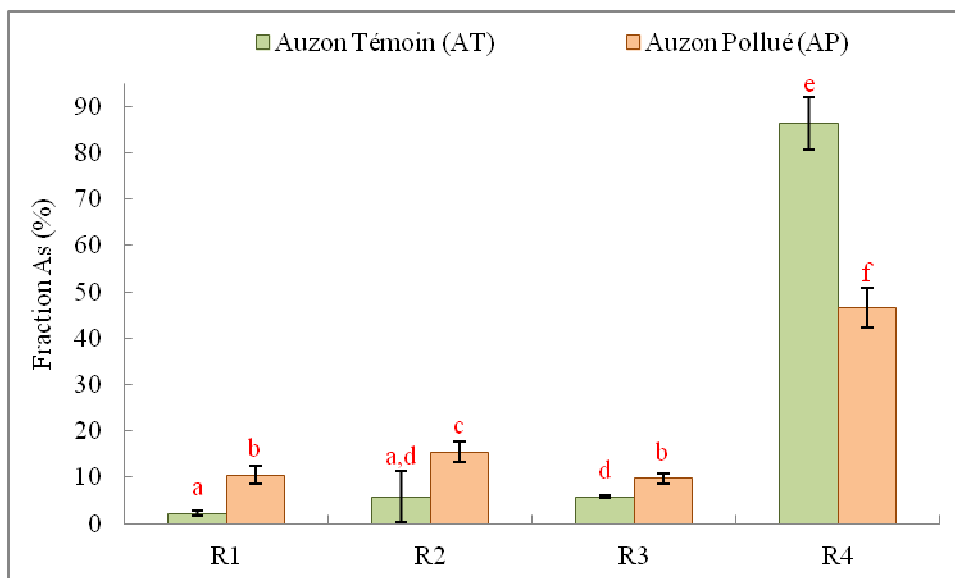


Figure III.4 : Distribution de l'As dans le sol AT et AP. R₁ : fraction échangeable et acido-soluble, R₂ : fraction réductible, As associé au Fe et au Mn, R₃: fraction oxydable et R₄ : fraction résiduelle (n = 4, les différentes lettres indiquent les groupes significativement différents, ANOVA, p < 0,05).

Le sol AP a une fraction échangeable et acido-soluble de l'As (R₁), considérée comme facilement mobilisable (Moszkowicz, 2002), 6 fois plus élevée que dans le sol AT (respectivement 12,7 % et 2,1 %). De même, la fraction oxydable (R₃) et celle associée au Fe et Mn (R₂) sont plus importantes dans le sol AP que celles observées dans le sol AT. Finalement, la fraction résiduelle d'As représente la majorité de l'As total présent dans les sols analysés (R₄ = 86,3 % et 56,7 % respectivement dans le sol AT et AP), elle est considérée comme faisant partie de la structure cristalline du sol. A noter que dans les échantillons du sol pollué (AP), les phases réductibles contiennent un pourcentage plus élevé d'As (R₂ = 18,8 %) que les fractions oxydables (R₃ = 11,9 %). Pour le sol AT, la répartition de l'As entre les phases oxydables et réductibles sont similaires (5,8 % pour R₂ et R₃).

4. Caractérisation floristique des sites d'études

Après avoir caractérisée la pollution du sol, il est intéressant de se pencher sur l'impact de ces contaminants sur la diversité et le développement des communautés végétales sur le site. Dans cette perspective, l'étude des communautés végétales qui vivent dans un environnement pollué offre plusieurs avantages (Remon *et al.*, 2009) :

- Elles sont en contact étroit et continu avec le substrat pollué ;

- Elles peuvent accumuler des ETM dans leurs parties aériennes de manière proportionnelle au contenu disponible dans le sol ;
- Leur taxonomie est bien établie et elles sont rapidement identifiables.

Par conséquent, une étude des associations végétales a été réalisée en 2008 sur le site d'Auzon témoin et pollué selon une approche phytosociologique (Braun-Blanquet, 1964).

Tableau III.4 : Caractéristiques des communautés végétales de chaque site témoin (AT) et pollué (AP).

Zones	Nombre d'espèces	Nombre de familles	Type de plante			Cycle de la plante	
			% Arborescent	% Arbustive	% Herbacée	% Annuelle	% Pérenne
Témoin (AT)	42	19	2,3	2,3	95,3	15,0	85,0
Polluée (AP)	42	28	0,0	9,5	90,5	9,8	90,2

L'examen botanique de la zone polluée (AP) a abouti à la détermination de 42 espèces et 28 familles (Tableau III.4). La plupart de ces espèces sont des herbacées vivaces, la famille la plus représentée étant les Poaceae (Tableau III.5). Quelques arbustes se sont développés sur la parcelle, tel que *Cytisus scoparius*, ou encore *Rubus fruticosus*. Malgré cette diversité taxonomique, la végétation n'est pas uniforme et, à l'intérieur de chaque quadrant, le couvert végétal, le nombre de taxons et le type d'espèces dominantes sont assez variables. Finalement, la zone étudiée est caractérisée par un couvert végétal mixte et dense (près de 100 % de la couverture du sol), il est essentiellement dominé par *Agrostis capillaris* et *Arrhenaterum elatius*, la strate arbustive étant essentiellement représentée par *Cytisus scoparius*.

Tableau III.5 : Relevé floristique de la végétation du site témoin (AT) et de la friche industrielle polluée (AP) réalisé en juin 2008.

Espèces végétales			Abondance-dominance		Strate
Famille	Espèce latin	Nom français	AT	AP	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Amaranthe réfléchie	1		Herbacée
Apiaceae	<i>Daucus carota</i>	Carotte sauvage		+	Herbacée
Araliaceae	<i>Hedera helix</i>	Lierre commun		1	Herbacée
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i>	Achille millefeuille	1	1	Herbacée
	<i>Bellis perennis</i>	Paquerette	+		Herbacée
	<i>Cirsium arvense</i>	Chardon des champs	+	+	Herbacée
	<i>Lapsana communis</i>	Lampsane commune	1		Herbacée
	<i>Taraxacum ruderalia</i>	Pissenlit dent de lion	2		Herbacée
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>	Vipérine commune		+	Herbacée
Campanulaceae	<i>Campanula rotundifolia</i>	Campanule à feuille ronde		1	Herbacée
Caryophyllaceae	<i>Cerastium fontanum</i>	Ceraiste commun	+		Herbacée
	<i>Saponaria officinalis</i>	Saponaire officinale		1	Herbacée
	<i>Silene latifolia</i>	Compagnon blanc		+	Herbacée
	<i>Silene vulgaris</i>	Silène enflé	1	+	Herbacée
	<i>Stellaria graminea</i>	Stellaire graminée	+		Herbacée
	<i>Stellaria media</i>	Mouron des oiseaux	+		Herbacée
Convolvulaceae	<i>Convolvus arvensis</i>	Liseron des champs	+	2	Herbacée
Dipsacaceae	<i>Knautia arvensis</i>	Knautie des champs	1	+	Herbacée
Equisetaceae	<i>Equisetum arvense</i>	Prêle des champs		1	Herbacée
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia amygdaloides</i>	Euphorbe des bois		1	Herbacée
	<i>Euphorbia cyparissias</i>	Euphorbe petit cyprès		1	Herbacée
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i>	Lotier corniculé	+		Herbacée
	<i>Medicago lupulina</i>	Luzerne lupuline	1		Herbacée
	<i>Trifolium pratense</i>	Trèfle des près	+		Herbacée
	<i>Trifolium repens</i>	Trèfle blanc	2		Herbacée
	<i>Vicia hirsuta</i>	Vesce hérissée		+	Herbacée
	<i>Vicia sepium</i>	Vesce des haies	+		Herbacée
Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i>	Erodium bec de grue	1		Herbacée
	<i>Geranium columbinum</i>	Géranium des colombes	+		Herbacée
Juncaceae	<i>Juncus inflexus</i>	Jonc glauque		+	Herbacée
Liliaceae	<i>Asparagus officinalis</i>	Asperge sauvage		+	Herbacée
	<i>Muscari comosum</i>	Muscari à toupet		+	Herbacée
Malvaceae	<i>Malva sylvestris</i>	Grande mauve	1		Herbacée
Onagraceae	<i>Epilobium angustifolium</i>	Epilobe à feuille étroite	1	1	Herbacée
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i>	Plantain lancéolé	1	+	Herbacée
	<i>Plantago major</i>	Grand plantain	1		Herbacée
Poaceae	<i>Agrostis capillaris</i>	Agrostide commune	1	3	Herbacée
	<i>Agrostis stolonifera</i>	Agrostide stolonifère	1	1	Herbacée
	<i>Alopecurus pratensis</i>	Vulpin des près		+	Herbacée
	<i>Arrhenaterum elatius</i>	Avoine élevée	1	2	Herbacée
	<i>Calamagrostis arundinacea</i>	Calamagrostis faux-roseaux	1	+	Herbacée
	<i>Dactylis glomerata</i>	Dactile agglomérée	1	+	Herbacée
	<i>Elytrigia repens</i>	Chiendent officinale	2		Herbacée
	<i>Holcus lanatus</i>	Houlque laineuse	1	1	Herbacée
	<i>Poa pratensis</i>	Paturin des près	1	+	Herbacée
Polygonaceae	<i>Rumex acetosa</i>	Oseille sauvage	1		Herbacée
	<i>Rumex acetosella</i>	Rumex petit-oseille		+	Herbacée

Tableau III.5 suite

Espèces végétales			Abondance-dominance		Strate
Famille	Nom latin	Nom français	AT	AP	
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	Pourpier		1	Herbacée
Primulaceae	<i>Lysimachia nummularia</i>	Lysimaque nummulaire	+		Herbacée
Renonculaceae	<i>Ranunculus acris</i>	Renoncule âcre	1		Herbacée
Rosaceae	<i>Fragaria vesca</i>	Fraisier sauvage	+		Herbacée
	<i>Potentilla sp.</i>	Potentille sp.	1		Herbacée
	<i>Rubus fruticosus</i>	Ronce commune	+	1	Herbacée
Rubiaceae	<i>Galium aparine</i>	Gaillet gratteron	1	1	Herbacée
	<i>Galium mollugo</i>	Gaillet doux	+		Herbacée
Scrophulariaceae	<i>Linaria repens</i>	Linaires rampante		1	Herbacée
Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i>	Morelle noire		+	Herbacée
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i>	Ortie dioica	+	+	Herbacée
Valerianaceae	<i>Valeriana officinalis</i>	Valériane officinale		1	Herbacée
Cannabaceae	<i>Humulus lupulus</i>	Houblon		+	Arbustive
Caprifoliaceae	<i>Lonicera periclymenum</i>	Chèvrefeuille des bois	1		Arbustive
Cornaceae	<i>Cornus sanguinea</i>	Cornouiller sanguin		+	Arbustive
Fabaceae	<i>Cytisus scoparius</i>	Genêt à balai		+	Arbustive
Oleaceae	<i>Ligustrum vulgare</i>	Troène sauvage		+	Arbustive
Rosaceae	<i>Prunus spinosa</i>	Prunier sauvage		+	Arbustive
	<i>Rosa canina</i>	Eglantier commun		+	Arbustive
Salicaceae	<i>Populus tremula</i>	Tremble		+	Arbustive
Salicaceae	<i>Populus nigra</i>	Peuplier noir	1		Arborescente

Un travail similaire réalisé sur la friche témoin montre comme sur le site pollué une dominance des herbacées (Tableau III.5). Cependant, l'identification floristique sur le site témoin (AT) met en évidence une diversité plus élevée en nombre d'espèces dans les quadrants (19 espèces par quadrant pour AT contre 13 pour le site AP). Au-delà de la présence en nombre de graminées (8 espèces), trois familles dominent, les Fabacées et les Astéracées avec cinq espèces, les Caryophyllacées avec quatre espèces. Par ailleurs, contrairement à la zone polluée, *A. capillaris* n'est pas l'espèce majoritaire sur le site témoin. L'agrostide commune, espèce acidophile très présente sur le site pollué, semble s'être adaptée aux polluants métalliques présents en quantité dans le sol. De plus, elle possède des propriétés allélopathiques qui limitent la germination des autres espèces (Delabays *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la Figure III.5 présente la contribution des différentes familles végétales dans la végétation de chaque site. Alors que les *Poaceae* sont dominantes sur les deux sites, leur proportion est plus importante sur le site pollué (AP) que sur le site témoin (AT) (36 % avec 8 espèces sur AT contre 51 % avec 7 espèces sur AP). De même, la proportion de *Fabaceae* et d'*Asteraceae* est presque six fois supérieure sur le site témoin par rapport au site contaminé (respectivement la proportion est de 11 et 13 % sur le site AT contre 1,5 et 2,5 %

sur le site AP). Seules les *Caryophyllaceae* présentent une proportion équivalente entre le site témoin et pollué (5 % pour AT contre 4 % pour AP).

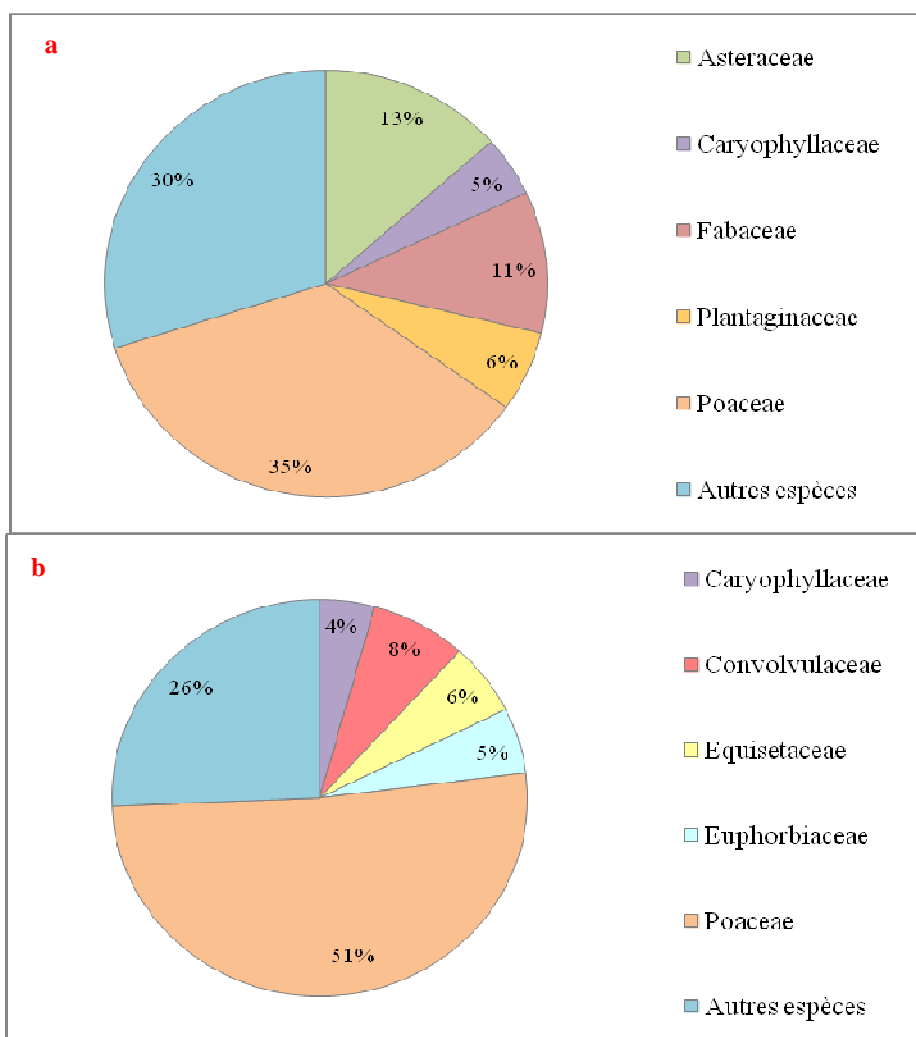


Figure III.5 : Proportion des familles de plantes pour chaque site, le site témoin (AT) (a) et le site pollué (AP) (b).

5. Phytoaccumulation de l'As et du Pb par la végétation

A la suite de l'étude floristique, l'accumulation par la végétation de l'As et du Pb, deux des principaux contaminants présents dans le sol de la parcelle polluée, a été évaluée en mesurant leurs concentrations dans les feuilles et les racines de 6 espèces végétales dominantes prélevées dans différents quadrants. Les résultats sont présentés dans la Figure III.6.

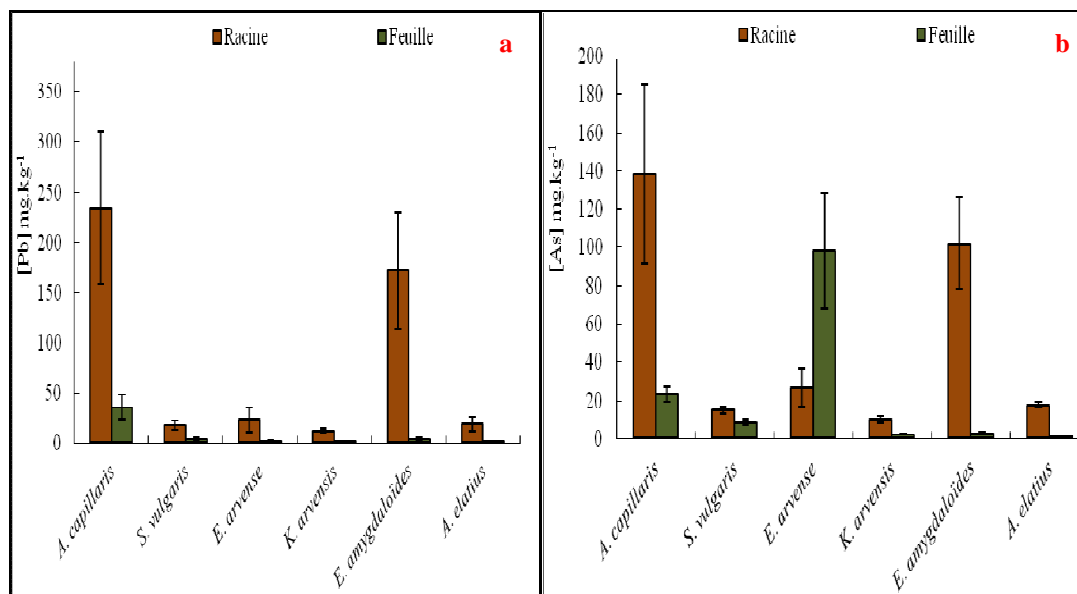


Figure III.6 : Concentrations en Pb (a) et en As (b) dans les feuilles et les racines d'espèces dominantes prélevées dans la zone polluée (AP) (n = 4).

Les teneurs moyennes mesurées dans les plantes prélevées sur site s'élèvent dans les feuilles à 22,8 mg.kg⁻¹ pour l'As et à 8,0 mg.kg⁻¹ pour le Pb. Dans les racines, les concentrations moyennes mesurées sont de 51,7 mg.kg⁻¹ pour l'As et 80,0 mg.kg⁻¹ pour le Pb. La tendance générale montre donc une teneur significativement plus élevée dans les racines que dans les feuilles quelque soit l'ETM étudié. Les résultats suggèrent également que, indépendamment de la teneur en As et en Pb dans le sol, les différentes espèces végétales présentes sur le site avaient des capacités variées d'absorber et d'accumuler les polluants. Par exemple, *Agrostis capillaris* et *Euphorbia amygdaloides* absorbent 5 à 10 fois plus d'As et de Pb que les autres espèces étudiées, *Equisetum arvense* absorbant préférentiellement l'As. Par ailleurs, contrairement aux autres espèces, *E. arvense* stocke préférentiellement l'As dans ces parties aériennes.

6. Discussion

6.1. Evaluation et caractérisation de la pollution du site d'Auzon

La présente étude a été réalisée sur un ancien site industriel dont l'activité a débuté en 1902 par l'exploitation minière d'arsénopyrite pour la fabrication de produits arséniés destinés essentiellement à l'agriculture. L'activité a été interrompue en 1949, il a ensuite servi au

stockage de produits chimiques de la seconde guerre mondiale. Il en résulte un sol fortement perturbé dont l'une des caractéristiques majeures est la présence de niveaux relativement élevés d'ETM et métalloïdes comme l'As, et dans une moindre mesure le Pb, l'Sb et le Cu. Ces concentrations en ETM sont largement supérieures à celles mesurées dans les sols naturels non pollués (Baize, 2010), confirmant ainsi une pollution polymétallique très importante. Par ailleurs, les caractéristiques pédochimiques des deux sols indiquent une texture limoneuse sableuse, un pH faiblement acide (entre 6 et 7), un niveau relativement élevé de carbone organique et une teneur en azote faible, à l'origine d'un rapport C/N inhabituellement élevé. Bien que la raison d'un tel ratio C/N ne soit pas claire, ce résultat pourrait être dû à la présence d'un couvert végétal important qui apporte de la matière organique en quantité. En effet, une potentielle diminution de l'activité microbienne est souvent observée dans des sols présentant des pollutions métalliques (Ghosh *et al.*, 2004) et peut-être responsable d'une faible dégradation des composés organiques qui se retrouvent en excès.

Concernant l'As, l'étude du profil des concentrations dans le sol AP, qui diminuent avec la profondeur, met, d'une part, clairement en évidence une origine anthropique de la pollution à l'As présent dans l'horizon de surface. Ces résultats sont en accord avec ceux de Matera (2001) et Cancès (2004) qui ont effectué des prélèvements dans d'autres zones de la friche industrielle. Au contraire, le sol AT, dont les teneurs en As dans l'horizon de surface sont proches de 250 mg.kg^{-1} , ne montre pas de variations significatives des concentrations en As avec la profondeur. L'As présent en surface a donc une origine naturelle héritée du fond pédogéochimique. En effet, la région du Massif Central français est caractérisée par un fond pédogéochimique élevé en As hérité du socle d'origine volcanique et de gisements hydrothermaux de soufre (Morin *et al.*, 2002). Les concentrations d'As dans les sols naturels du Massif Central dépassent fréquemment 300 mg.kg^{-1} et peuvent même atteindre 1000 mg.kg^{-1} , comme par exemple dans le domaine Echassières (Allier, France) (Morin *et al.*, 2002). D'autre part, les extractions séquentielles réalisées sur les deux sols d'Auzon (AT et AP) ont permis de mettre en évidence une plus grande disponibilité de l'As dans le sol AP. La fraction R_1 , représentant la fraction échangeable et acido-soluble, est 6 fois plus importante dans le sol AP que dans le sol AT. Cette caractéristique augmente les risques environnementaux liés à la pollution du sol AP. En effet, des analyses réalisées par Sanjuan *et al.* (2001) ont montré des transferts fréquents de l'As vers les milieux aquatiques environnants de la friche industrielle, en particulier vers le ruisseau de l'Auzon et la rivière de l'Allier. De plus, d'après l'extraction sélective, le site pollué (AP) présente une fraction réductible deux fois plus importante que la part oxydable de l'As. Ce résultat indique une fixation

préférentielle de l'As sur les oxyhydroxydes de Fe, caractéristique confirmée par l'étude de Cancès (2004). Une remobilisation de l'As présent dans les fractions R₂ et R₃ peut avoir lieu lors de changement des conditions physico-chimiques du sol (Coulibaly *et al.*, 2010), et notamment des modifications des conditions oxydo-réductrices pouvant intervenir en période de crue (Laperche et Eisenlohr, 2001). Cependant, une majorité de l'As se retrouve piégée sur les phases résiduelles du sol (respectivement 86,3 % et 56,7 % pour le sol AT et AP) et n'est donc pas disponible pour les plantes ou les organismes vivants du sol. Cette caractéristique peut être la conséquence de l'existence de liaisons fortes entre l'As et les complexes silicatés du sol (Moszkowicz, 2002). Sur le sol AP, l'As présente donc une fraction mobilisable plus importante que sur le sol AT qui justifie une phytotoxicité élevée de l'As dans le site contaminé. Par ailleurs, les travaux de Cancès *et al.* (2005) ont montré que l'As présent dans le sol de la friche industrielle se trouvait majoritairement sous forme d'arséniate (AsV), moins toxique et moins mobile que l'arsénite (As(III)) (Geiszinger *et al.*, 2002). L'analyse des contenus en ETM dans les végétaux se développant en environnement pollué peut apporter des données utiles pour caractériser la biodisponibilité des ETM dans le sol (Fränzle, 2006).

6.2. Etude de la flore métallicole

Le relevé floristique effectué sur la friche industrielle (AP) montre que la zone polluée est colonisée par un certain nombre d'espèces végétales en dépit de la présence de polluants métalliques. Malgré la pollution, le site présente donc une couverture végétale dense et mixte avec une dominance des graminées et notamment d'*Agrostis capillaris*. Cependant, à titre de comparaison, l'étude du couvert végétal de la friche non contaminée (AT), située à proximité du site pollué et présentant des caractéristiques pédochimiques proches (structure et texture du sol, pH), met en évidence une diversité végétale plus forte que celles observées sur la friche industrielle. La détermination de l'indice de Shannon (H') (Tableau III.6) pour chaque zone confirme une plus grande diversité des espèces dans les quadrants du site non pollué. De même, l'indice d'équitabilité (E) est plus faible sur le site pollué et met ainsi en avant la dominance du peuplement de la friche industrielle par *A. capillaris*. La valeur élevée de E pour le site témoin montre une relative homogénéité dans la répartition des espèces. Une constatation similaire a été relevée par Dazy et ses collaborateurs (2008) sur un site pollué au Cd et aux hydrocarbures. De même, Otones et son équipe (2011) ont également mesuré une réduction de la biodiversité de la flore sur un site minier contaminé à l'As en comparaison à un site non pollué.

Tableau III.6 : Indice de Shannon (H') et d'Equitabilité (E) déterminés sur chaque site, Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP).

	I _{shannon} (H')	I _{équitabilité} (E)
Auzon Témoin (AT)	2,34 ± 0,31	0,78 ± 0,08
Auzon Pollué (AP)	1,64 ± 0,32	0,44 ± 0,08

Par ailleurs, malgré la présence d'espèces communes entre les deux sites (*A. millefolium*, *P. lanceolata*, *S. vulgaris*, *A. elatius*), appelées pseudométallophytes, des différences sont observées au niveau de la composition floristique. En témoigne la faible valeur de l'indice de similarité de Jacquard (24 %) calculé entre les deux sites, témoin (AT) et pollué (AP), relevant peu de similitude entre la végétation de chaque site. Cette variabilité floristique, influencée par la pollution du sol, met en avant une capacité d'adaptation et de tolérance des pseudométallophytes, leur permettant de coloniser un milieu perturbé. De plus, la faible compétition des espèces végétales pour ces niches écologiques peut favoriser le développement de ces espèces tolérantes à la pollution du sol AP. *A. capillaris* présente essentiellement sur le site contaminé, ainsi que *E. arvense* ou les *Euphorbiaceae*, peuvent être considérées comme des pseudométallophytes électives. Elles présentent une plus grande vitalité sur les zones polluées en ETM que sur les terrains non pollués (Dazy, 2008).

Par conséquent, les contaminants présents dans le sol ont clairement un impact sur la structure des communautés végétales. De fait, pour se développer sur un site contaminé, les espèces métallocoles utilisent différentes stratégies d'adaptation (Frérot, 2006) :

- Soit en modifiant leur rhizosphère par l'exsudation de composés rendant les ETM moins solubles ou entraînant leurs précipitations sous formes insolubles dans la rhizosphère (Koo *et al.*, 2010) et permettant ainsi l'exclusion ou la diminution de la phytotoxicité des ETM au niveau de la rhizosphère (Cai et Ma, 2003 ; Capilla, 2005) ;
- Soit par l'absorption et la détoxification des ETM au sein de la plante par chélation des cations métalliques ou métalloïdes ou par séquestration des ETM principalement dans le système vacuolaire (Cai et Ma, 2003), permettant ainsi leur transformation vers une forme physiologiquement tolérable.

L'étude des teneurs en As et Pb dans les plantes prélevées sur site a permis d'apporter des précisions sur les différentes stratégies mises en place par les plantes pour tolérer la présence de ces polluants dans le sol.

Les Facteurs de Bioaccumulation (FB) de l'As et du Pb de chaque espèce (Tableau III.7) montrent que le développement et la tolérance de certaines de ces espèces aux polluants du sol requiert une stratégie excluante, tel est le cas pour *S. vulgaris*, *K. arvensis* et *A. elatius* pour le Pb et l'As et *E. arvense* pour la tolérance au Pb. Cette stratégie de tolérance par exclusion semble être commune à la majorité des espèces végétales présentes dans des sites pollués à l'As (Wang *et al.*, 2002 ; Otones *et al.*, 2011). Au contraire, *E. amygdaloides* et *A. capillaris* accumulent une partie de l'As et du Pb présents dans le sol. En effet, *A. capillaris* est une monocotylédone reconnue pour être une espèce tolérante à l'As et pouvant se comporter comme une pseudométallophyte accumulatrice d'As (Duquesnoy *et al.*, 2009). Benson et son équipe (1981) ont montré que cette espèce était capable de se développer sur des déchets de fonderie en Angleterre et accumuler de l'As jusqu'à 1 % de son poids sec. De même, *E. arvense* accumule en quantité l'As avec des teneurs proches de 100 mg.kg⁻¹ dans les feuilles. Une étude menée par Piquet-Pissaloux et Robin (2006) sur le site d'Auzon a mis en avant le caractère accumulateur de *E. arvense* vis-à-vis de l'As. Ces espèces sont ainsi capables de détoxifier l'As et/ou le Pb absorbés, par séquestration ou par complexation, permettant leur stockage dans les tissus de la plante.

Tableau III.7 : Facteurs de bioaccumulation (FB) et de translocation (FT) calculés pour les différentes espèces prélevées sur le site d'étude (n = 4).

	FB		FT	
	As	Pb	As	Pb
<i>A. capillaris</i>	0,024 ± 0,007	0,061 ± 0,019	0,185 ± 0,031	0,156 ± 0,036
<i>S. vulgaris</i>	0,003 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,747 ± 0,360	0,256 ± 0,132
<i>E. arvense</i>	0,016 ± 0,005	0,006 ± 0,003	3,290 ± 1,647	0,075 ± 0,027
<i>K. arvensis</i>	0,002 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0,242 ± 0,044	0,132 ± 0,033
<i>E. amygdaloïdes</i>	0,014 ± 0,004	0,040 ± 0,013	0,029 ± 0,006	0,021 ± 0,002
<i>A. elatius</i>	0,002 ± 0,000	0,005 ± 0,002	0,104 ± 0,030	0,052 ± 0,023

Cependant, l'étude des facteurs de translocations (FT) de l'As et du Pb (Tableau III.7) calculés pour chaque espèce met en évidence un très faible transfert du Pb vers les parties aériennes, le Pb absorbé par les plantes étant essentiellement stocké dans les racines. En ce qui concerne l'As, les facteurs de translocation indiquent un transfert de l'As vers les parties

aériennes chez *E. arvense* ($FT > 3$). Malgré un facteur de bioaccumulation de l'As faible, sa capacité à stocker l'As dans ces parties aériennes peut être considérée comme un des critères de l'hyperaccumulation de l'As selon les travaux de Zhao et son équipe (2009). De même, *S. vulgaris* présente un facteur de translocation de l'As proche de 1, cependant les teneurs observées dans les différents tissus de la plante semblent indiquer, comme précisé précédemment, une stratégie excluante vis-à-vis de l'As.

D'après la Directive Européenne 2003/100/CE (2003) qui détermine les teneurs maximales en produits indésirables dans l'alimentation animale, les seuils autorisés pour l'As et le Pb sont de 2 et 40 mg.kg^{-1} respectivement. Or, les concentrations en As observées dans les parties aériennes des écotypes de *A. capillaris*, *S. vulgaris* et *E. arvens*, espèces indigènes au site pollué d'Auzon, atteignent des valeurs largement plus élevées. Les teneurs foliaires en As chez ces 3 espèces sont respectivement de 23,2, 8,8 et 98,2 mg.kg^{-1} de MS. Ces teneurs élevées supposent un risque significatif de l'incorporation de ces ETM et de leur accumulation dans les niveaux supérieurs de la chaîne trophique.

Le développement des plantes sur des sols métallurgiques ne dépend pas seulement des teneurs totales et disponibles en ETM. Les contraintes édaphiques jouent un rôle majeur dans la sélection des associations de plantes spécifiques. En effet, en plus des niveaux élevés d'ETM, il est évident que les déchets métallifères sont des environnements inhabituels pour les plantes (Tordoff *et al.*, 2000) en raison de la présence de nombreux autres facteurs limitant la croissance tels que les carences en macronutriments, un pH faible et de faibles teneurs en azote (Remon *et al.*, 2005 ; Shu *et al.*, 2005). Ainsi, il est très probable que les associations végétales qui se développent dans ces habitats particuliers sont adaptées d'une part au niveau de pollution relevé dans le sol et d'autre part aux propriétés physico-chimiques du sol. Ainsi, l'étude des processus de colonisation végétale dans les sols contaminés anthropiques s'avère très utile pour mieux comprendre le fonctionnement de ces environnements complexes (Remon, 2009).

Il est désormais largement admis que la restauration d'un couvert végétal sur des friches industrielles abandonnées, en plus de l'aspect esthétique, est très efficace dans la réduction de l'érosion du sol et du transfert des polluants (Wong, 2003). Par conséquent, les stratégies de phytorestauration sont maintenant considérées comme des méthodes de réhabilitation efficaces et écologiques qui devraient être encouragées dans la perspective de gestion durable des terres. Il est important d'utiliser des plantes indigènes pour la phytoremédiation, car celles-ci présentent de meilleures capacités de tolérance, et donc de

développement. Dans ce contexte, l'identification d'espèces susceptibles de tolérer les polluants métalliques étudiés et de se développer sur des friches contaminées est primordiale pour la compréhension des mécanismes de tolérance et pour la sélection d'espèces destinées à la revégétalisation de sites contaminés.

Chapitre II : Culture sur sol de 4 espèces végétales en conditions contrôlées

Cette étude vise à évaluer l'effet induit par la pollution des sols sur le développement et les activités physiologiques et biochimiques de quatre espèces de plantes, *Solanum nigrum*, *Agrostis capillaris*, *Vicia faba* et *Cannabis sativa*. *A. capillaris* et *S. nigrum* sont deux espèces indigènes du site industriel de la Vieille Usine d'Auzon et *V. faba* est une espèce modèle en biologie (Pourrut, 2008 ; Sougir *et al.*, 2008). *C. sativa* a été sélectionnée pour sa biomasse végétale importante qui peut soit augmenter les capacités de stockage des ETM, soit obtenir une biomasse valorisable en cas de faible transfert des ETM dans la partie aérienne. En parallèle, l'évolution du contenu et de la spéciation de l'As dans le sol, principal polluant du site d'Auzon, sont observées après la culture des plantes. L'objectif de cette étude est divisé en quatre axes principaux :

- L'adaptation et le développement des espèces végétales en culture sur des sols prélevés sur la friche industrielle d'Auzon ;
- L'impact de la pollution sur la physiologie et le métabolisme des plantes ;
- La capacité des plantes à assimiler et à transférer l'As dans les feuilles ;
- Evaluer l'action des plantes sur la biodisponibilité de l'As dans le sol.

Ce travail s'inscrit dans un projet de phytostabilisation du site industriel de la Vieille Usine d'Auzon en Haute Loire. Pour évaluer la toxicité des ETM en excès dans le sol AP (As, Sb, Pb, Cd, Cu), les cultures de plantes ont été réalisées sur trois types de sol, les sols AT et AP ainsi qu'un terreau (condition de référence).

1. Evaluation de la toxicité des ETM chez 4 espèces végétales

1.1. Effet des ETM sur le développement des plantes

1.1.1. Développement de la biomasse végétale

Lors de la culture de ces 4 espèces sur le sol AT, le développement de la biomasse aérienne et racinaire ne montre pas de différence significative par rapport aux mesures de biomasse réalisées sur des plantes cultivées sur terreau (Figure III.7).

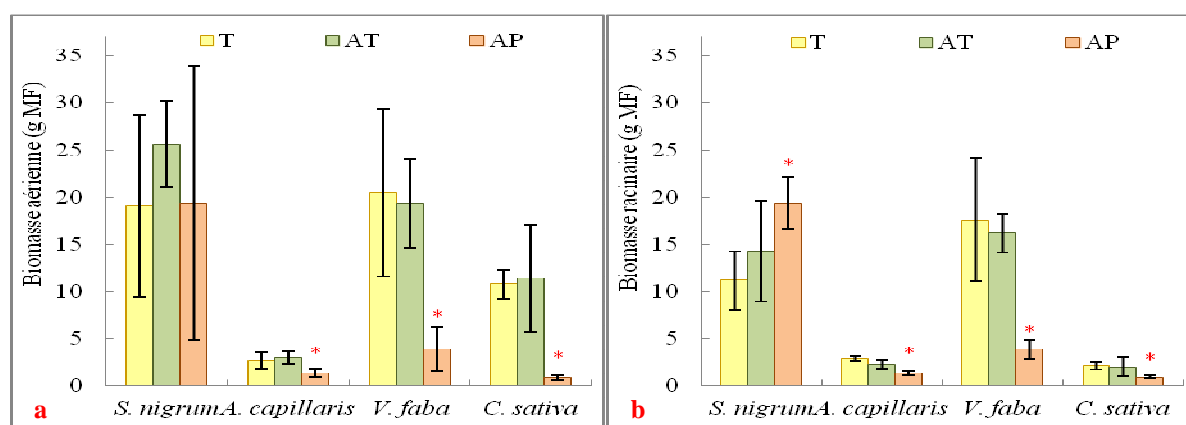


Figure III.7 : Biomasse aérienne (a) et racinaire (b) des différentes espèces végétales *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa* cultivées sur différents types de sol, le terreau (T, condition de référence), Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP) (n = 8, (*) indiquent les différences significatives par rapport aux conditions de référence (T), ANOVA, p < 0,05).

Par contre, la pollution du sol aux ETM, observée dans le sol AP, entraîne une diminution de la croissance des quatre espèces végétales. La biomasse aérienne de *V. faba*, *C. sativa* et *A. capillaris* est significativement réduite de 82,5 %, 92 % et 56,5 % respectivement, par rapport aux plantes cultivées sur terreau (Figure III.7a). Une diminution similaire est également notée pour les racines (89,1 %, 89,2 % et 82,8 % respectivement pour *V. faba*, *C. sativa* et *A. capillaris*, Figure III.7b). La culture de *S. nigrum* sur le sol AP n'affecte significativement que la croissance du système racinaire.

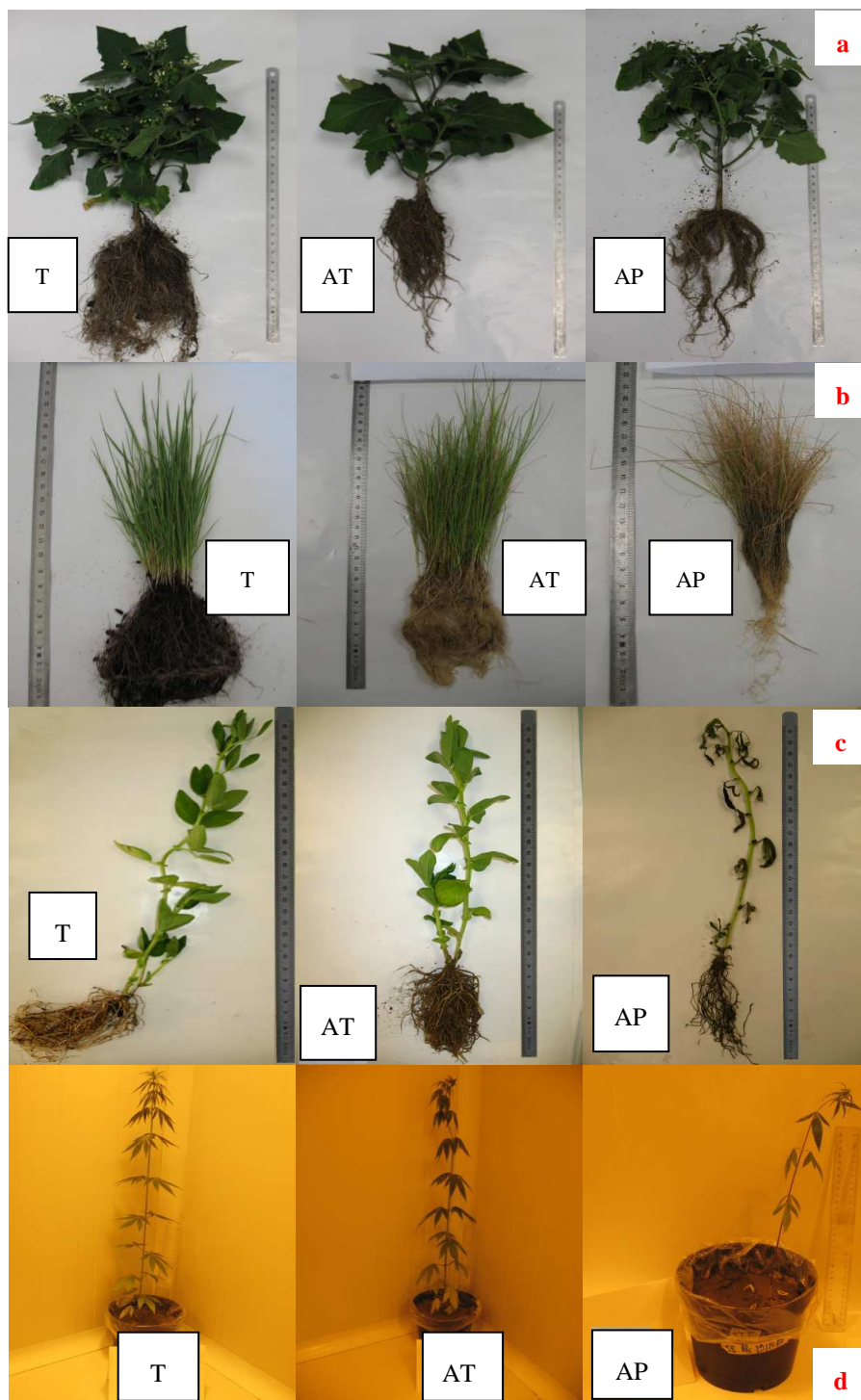


Figure III.8 : Plants de *S. nigrum* (a), *A. capillaris* (b), *V. faba* (c) et *C. sativa* (d) après un mois de culture sur les différents types de sol, Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP).

L'observation macroscopique des plantes confirme ce constat (Figure III.8). En effet, les individus cultivés sur le sol AP semblent subir un stress plus marqué que sur les sols T et AT, particulièrement chez *C. sativa* et *V. faba* dont la biomasse aérienne est fortement réduite.

V. faba montre le développement de nécroses au niveau des feuilles synonymes de sénescence des tissus.

La pollution du sol AP a donc un impact plus important sur le développement de *V. faba* et *C. sativa* que sur les autres espèces végétales. L'observation du développement de *S. nigrum* sur sol pollué tend à valider l'hypothèse selon laquelle cette espèce supporte une contamination importante aux ETM.

1.1.2. Teneur en eau des plantes (TE)

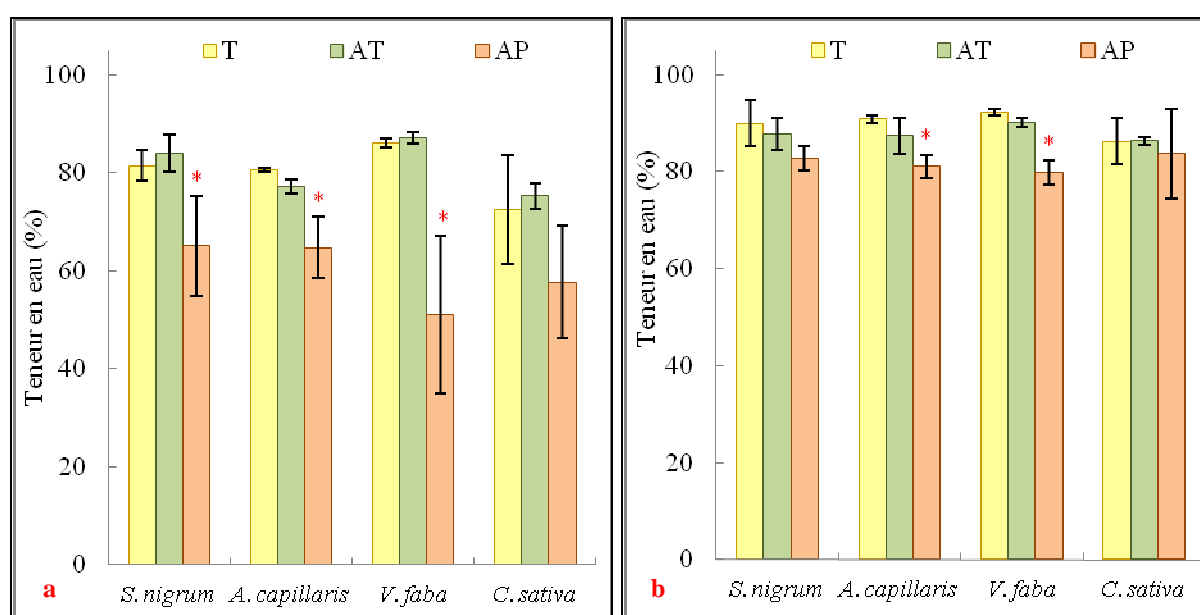


Figure III.9 : Teneur en eau (TE) dans les feuilles (a) et les racines (b) des 4 espèces végétales en fonction du type de sol, le Terreau (T), Auzon Témoin (AT) ou Auzon Pollué (AP), (n = 8, (*) indiquent les différences significatives par rapport aux conditions de référence (T), ANOVA, $p < 0,05$).

L'évolution de l'état hydrique des plantes cultivées sur sols à différentes teneurs en ETM est variable en fonction de l'espèce végétale et de l'organe de la plante (Figure III.9). Pour *S. nigrum*, seul le compartiment foliaire présente une réduction significative de 16,5 % de la TE chez les plantes cultivées sur sol pollué (AP) par rapport aux conditions contrôles. *V. faba* montre une diminution de 35,1 % et de 12,4 % de la TE des feuilles et des racines respectivement en comparaison avec les individus témoins. Cette diminution est moins marquée chez *A. capillaris*, les fortes teneurs en polluants dans le sol (AP) entraînent une

réduction de la teneur en eau de 15,8 % dans les feuilles et 9,8 % dans les racines. *C. sativa*, espèce exigeante en eau, ne présente pas de variation significative de la TE dans ses différents organes. Cependant, une forte variabilité est mesurée chez cette espèce, ce qui semble indiquer une différence d'adaptation des individus à une même condition.

Ainsi, la diminution de la teneur en eau se traduit chez la plante par un dessèchement, liée à un facteur stress. La pollution des sols entraîne une perturbation de l'équilibre physiologique de la plante. Cependant, la teneur en eau chez ces 4 espèces reste supérieure à 50 % sur sol pollué, ce qui indique que les plantes maintiennent un certain degré d'homéostasie au travers de mécanismes adaptatifs.

1.2. Activités physiologiques et biochimiques des plantes

Dans une optique de développement d'un procédé de phytostabilisation, il est nécessaire de connaître les réactions des plantes vis-à-vis des ETM, permettant ainsi une sélection des espèces les plus adaptées pour la mise en place de cette technologie biologique.

Les impacts liés à ce type de stress peuvent être caractérisés par l'étude de différents paramètres physiologiques et biochimiques liés à l'activité photosynthétique.

1.2.1. Les échanges gazeux

La mesure des échanges gazeux au niveau des feuilles (Figure III.10) a été réalisée un jour avant la récolte, soit après 30 jours de culture sur sol.

Dans les conditions contrôles, la photosynthèse nette (P_n) mesurée chez les différentes espèces est supérieure à $4 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure III.10a). A l'exception de *V. faba*, celle-ci ne présente pas de variations significatives par rapport aux conditions contrôles pour l'ensemble des plantes cultivées sur le sol AT. Cependant, en présence de teneurs élevées en ETM dans le sol (AP), toutes les espèces végétales subissent une diminution significative de la P_n , supérieure à 50 % pour l'ensemble des espèces étudiées.

Par ailleurs, dans les conditions contrôles, la conductance stomatique (g_s) est variable selon les espèces végétales (Figure III.10b). En effet, elle est proche de $0,1 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ chez *A. capillaris*, autour de 0,05 chez *C. sativa* et *V. faba* et inférieure à $0,04 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ chez *S. nigrum*. Seule *V. faba* présente une réduction significative de la g_s sur le sol AT, la g_s moyenne obtenue sur AT étant sensiblement équivalente à celle mesurée sur AP. De plus, une inhibition de la g_s supérieure à 50 % est mesurée pour toutes les espèces végétales cultivées sur AP. Ces résultats indiquent que les fortes teneurs en ETM dans le sol entraînent chez les 4

espèces végétales une fermeture des stomates limitant l'évapotranspiration. Les résultats observés chez *V. faba* cultivée sur AT semblent indiquer une grande sensibilité de cette espèce à la pollution du sol.

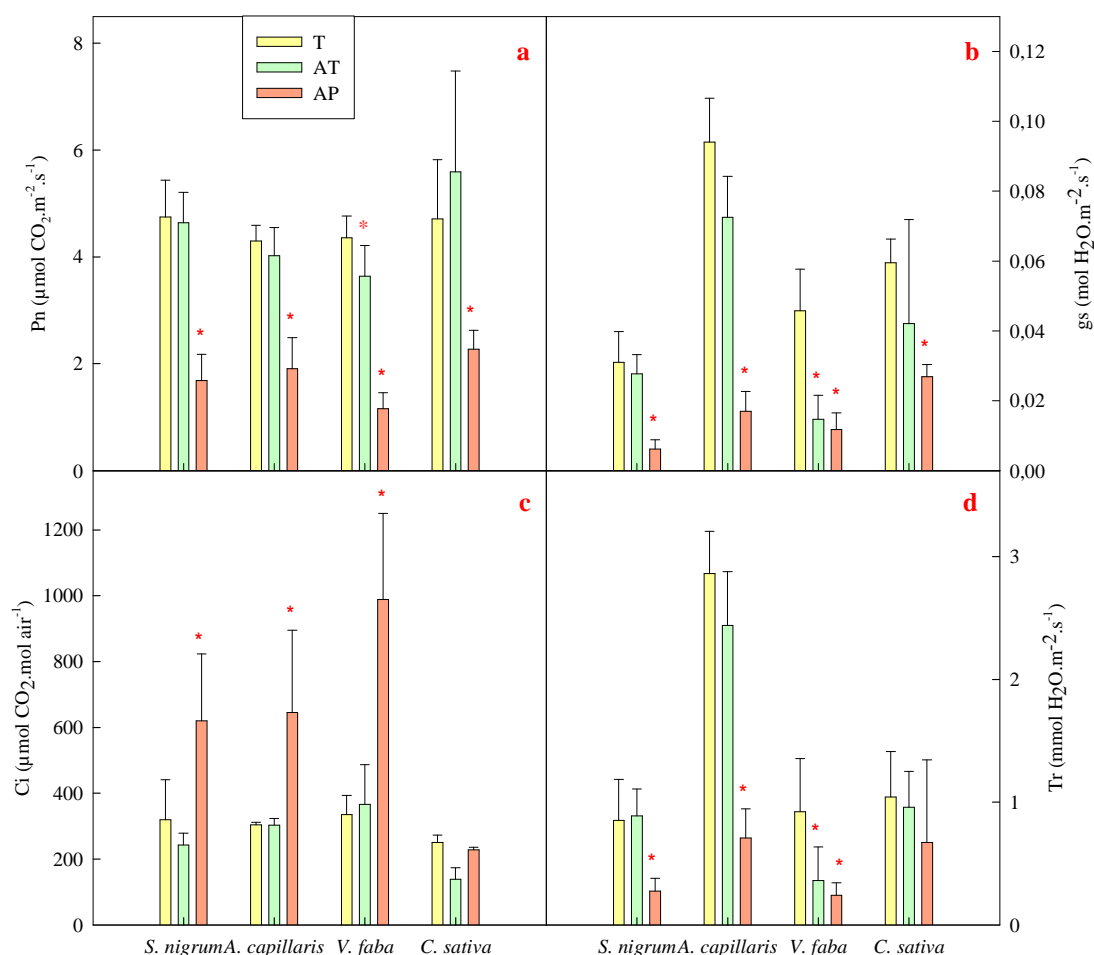


Figure III.10 : Mesure des échanges gazeux au niveau des feuilles pour les 4 espèces végétales cultivées sur les différents types de sol, Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Auzon Pollué (AP), (a) photosynthèse nette (Pn), (b) conductance stomatique (gs), (c) concentration intercellulaire en CO_2 (Ci), (d) transpiration (Tr), (n = 8, *) différences significatives par rapport aux conditions contrôles (T), ANOVA, $p < 0,05$).

La concentration en CO_2 intercellulaire dans les conditions contrôles est comprise entre 300 et 350 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol air}^{-1}$ chez *S. nigrum*, *A. capillaris* et *V. faba*, elle est égale à 250 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol air}^{-1}$ chez *C. sativa* (Figure III.10c). Aucune variation significative des concentrations en CO_2 dans les feuilles n'est observée pour les plantes cultivées sur AT par rapport aux conditions contrôles. Cependant, la culture des plantes sur AP entraîne une forte

augmentation du CO₂ intercellulaire chez les différentes espèces végétales exceptées *C. sativa*. Cette observation couplée à la diminution de la conductance stomatique indique que la pollution du sol cause un dysfonctionnement dans l'assimilation du CO₂ par la plante qui pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activité de la Rubisco.

L'évolution de la transpiration (Tr) (Figure III.10d) est corrélée à celle de la gs, paramètre contrôlant l'ouverture des stomates et donc le taux de transpiration chez les plantes. En effet, comme pour la gs, en absence d'un stress métallique, *A. capillaris* a une transpiration trois fois plus élevée (2,9 mmol H₂O.m⁻².s⁻¹) que chez *S. nigrum* et *V. faba* (environ 0,9 mmol H₂O.m⁻².s⁻¹). *C. sativa* présente une transpiration faible en condition contrôle, elle s'élève à 0,5 mmol H₂O.m⁻².s⁻¹, et ne montre pas de variation significative en présence d'un excès en ETM dans le sol (AP). Au contraire, une forte inhibition de la transpiration est observée chez *S. nigrum*, *A. capillaris* et *V. faba* cultivées sur AP, elle est réduite respectivement de 67, 75 et 74 % par rapport aux conditions contrôles. De même, une diminution significative est observée chez les plants de *V. faba* cultivés sur AT. L'altération de la conductance stomatique et de la transpiration chez cette espèce cultivée sur le sol AT semble avoir pour effet une réduction de l'assimilation nette du CO₂ dont l'absorption est en partie régulée par les stomates. L'excès en ETM dans les sols perturbe donc les flux hydriques au sein des plantes exceptée chez *C. sativa*. Cette perturbation est accentuée par un haut degré de fermeture des stomates en conditions de stress.

1.2.2. Teneurs en chlorophylles

La quantification des chlorophylles permet de connaître l'état physiologique d'une plante. La chlorophylle *a* fait partie du centre réactionnel qui permet la transformation de l'énergie photonique en énergie chimique. L'antenne collectrice, regroupant les chlorophylles *a* et *b*, absorbe les photons. Un stress abiotique, comme la présence en grande quantité d'un ETM dans le sol, peut entraîner une inhibition de la voie de biosynthèse ou de dégradation des chlorophylles et aboutir à un dysfonctionnement des photosystèmes. Ceci influe sur le rendement de la photosynthèse et diminue ainsi la production de biomasse. L'étude des teneurs en chlorophylles peut donc nous renseigner sur un éventuel impact de la pollution métallique d'un sol sur la voie de biosynthèse des chlorophylles.

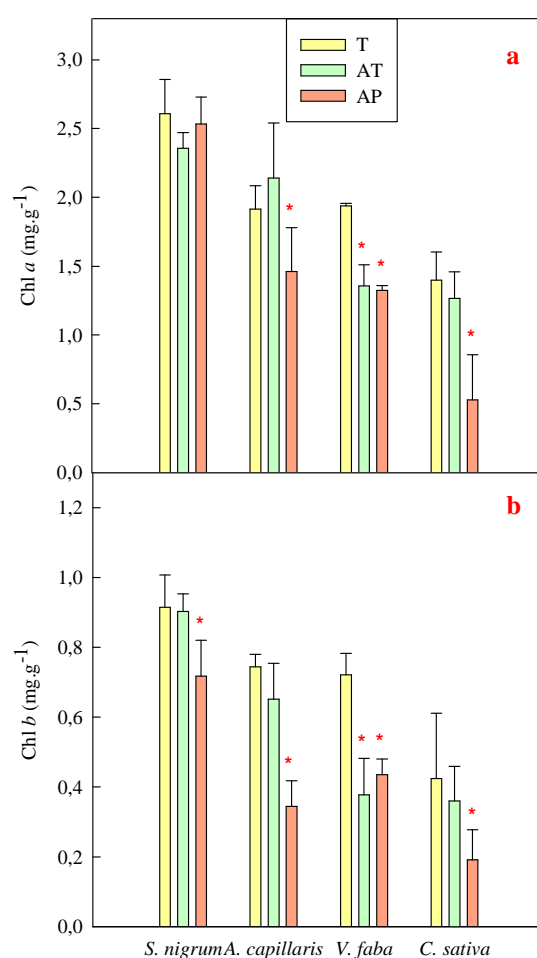


Figure III.11 : Teneurs en chlorophylles dans les feuilles de *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa* cultivées sur les 3 sols, le Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP), (a) teneur en chlorophylles *a* et (b) teneur en chlorophylles *b* (n = 8, *) indique les différences significatives par rapport aux conditions contrôles(T), ANOVA, p < 0,05).

Les concentrations en chlorophylles *a* et *b* (Figure III.11) varient en fonction des espèces étudiées et des conditions de culture. En conditions contrôles, deux espèces se démarquent, d'une part, *S. nigrum* présente des teneurs en chlorophylles *a* et *b* élevées, elles atteignent 2,6 mg.g⁻¹ pour les Chl *a* et 0,94 mg.g⁻¹ pour les Chl *b*. D'autre part, *C. sativa* est l'espèce dont les teneurs en chlorophylles sont les plus faibles, la concentration est de 1,4 mg.g⁻¹ pour les Chl *a* et de 0,5 mg.g⁻¹ pour les Chl *b*. Quel que soit le sol, *S. nigrum* ne montre pas de variation significative des teneurs en chlorophylles *a*. Pour cette espèce, une baisse significative des concentrations en chlorophylle *b* est observée entre les conditions contrôles (Chl *b* = 0,94 mg.g⁻¹) et le sol AP (Chl *b* = 0,67 mg.g⁻¹). Les teneurs en

chlorophylles *a* et *b* mesurées dans les feuilles de *V. faba* montrent une diminution significative pour les plantes cultivées sur les sols AT et AP par rapport aux conditions contrôles. Cette diminution, observée pour des faibles teneurs en As dans le sol AT, semble marquer la sensibilité de cette espèce à l'As comme en témoigne l'inhibition de la conductance stomatique et de la transpiration sur ce même sol. De même, la pollution aux ETM (sol AP) inhibe la biosynthèse des chlorophylles *a* et *b* chez *C. sativa* et *A. capillaris*. En effet, sur le sol AP, les teneurs en chlorophylle *a* et *b* sont réduites respectivement de 62 et 55 % pour *C. sativa* et de 24 et 53 % chez *A. capillaris* par rapport aux conditions contrôles.

1.2.3. Fonctionnement des photosystèmes II

Parallèlement à la mesure des échanges gazeux, les activités liées aux processus primaires de transfert d'électrons au niveau des photosystèmes ont été analysés. Les mesures ont été réalisées sur les 4 espèces un jour avant la récolte des plantes.

Quel que soit l'espèce végétale cultivée sur le sol AT, aucune variation significative n'est observée pour l'efficacité photochimique maximale des PSII (F_v/F_m), indicateur de leur efficacité photochimique et de leur aptitude à réduire l'accepteur primaire Q_A (Figure III.12a). Cependant, contrairement à *S. nigrum* qui n'enregistre pas de baisse de F_v/F_m sur le sol AP, *V. faba*, *A. capillaris* et *C. sativa* présentent une diminution de ce paramètre sur ce sol (respectivement une baisse de 20,8, 22,8 et 40,9 % par rapport aux conditions contrôles).

L'efficacité photochimique effective des PSII (Φ_{PSII}) est variable entre les différentes espèces dans les conditions contrôles, elle est proche de 0,60 chez *S. nigrum* et *A. capillaris*, elle atteint 0,68 chez *V. faba* et n'est que de 0,51 chez *C. sativa* (Figure III.12b). Cependant, peu de variations sont observées chez ces différentes espèces en présence d'ETM. En effet, seule l'efficacité photochimique d'*A. capillaris* et de *V. faba* est réduite significativement sur le sol AP.

Les faibles teneurs en As dans le sol AT n'ont donc pas d'impact sur le fonctionnement du PSII. Cependant, la présence de teneurs élevées en ETM dans le sol AP entraîne une perturbation du fonctionnement des PSII et semble agir plus particulièrement sur l'efficacité photochimique de ce photosystème (déterminée par F_v/F_m) et sur son aptitude à réduire l'accepteur primaire Q_A .

Les faibles valeurs observées chez *C. sativa* en conditions contrôlées pour l'ensemble des paramètres mesurés sont consécutives à l'entrée dans le cycle préfloraison de la plante responsable d'une faible teneur en chlorophylle observée dans la Figure III.11.

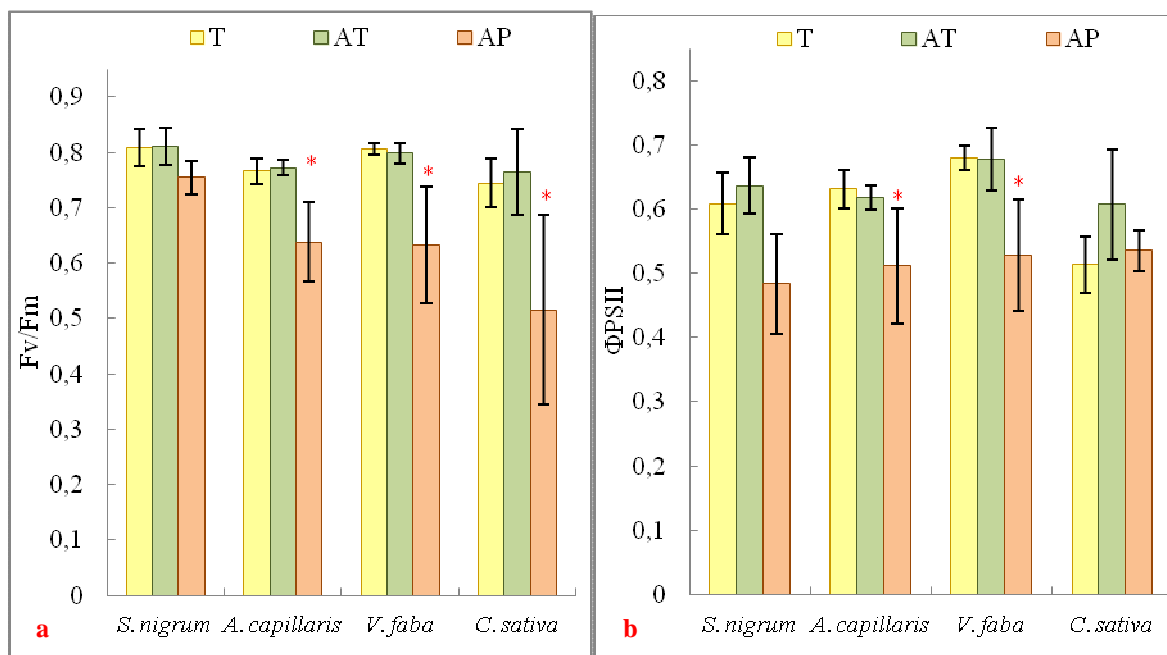


Figure III.12 : Paramètres de fluorescence de la chlorophylle *a* mesurés chez 4 espèces végétales, *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa*, cultivées sur 3 types de sol, Terreau (T), Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP), (a) efficacité photochimique maximale des PSII (F_v/F_m), (b) rendement de l'efficacité photochimique du PSII (Φ_{PSII}) ($n = 8$, *) différences significatives par rapport aux conditions contrôles (T), ANOVA, $p < 0,05$).

2. Absorption et stockage de l'arsenic et évolution de la disponibilité de cet élément dans le sol rhizosphérique

La plante est une pompe à nutriment. Pour intégrer un polluant du sol, celle-ci met en place différents mécanismes qui sont intimement liés à la CEC, au pH, au potentiel d'oxydoréduction et à la matière organique du sol. Au cours de cette étude, le comportement de l'As, polluant majeur dans le sol de la friche industrielle, sera étudié. Seul l'As disponible, c'est-à-dire présent dans la solution du sol ou adsorbé aux constituants du sol, peut être assimilé par les plantes. De ce fait, la culture des plantes sur sol pollué peut modifier les teneurs en As disponible présent dans le sol.

A la suite des cultures de plantes sur les différents sols, une analyse des teneurs en As dans les parties racinaires et aériennes de la plante a été réalisée. Par ailleurs, l'étude des phases porteuses de l'As dans le sol par extraction séquentielle a permis d'évaluer l'impact des plantes sur le fractionnement de l'As dans le sol.

2.1. Absorption et stockage de l'As

Les teneurs en As dans les plantes après un mois de culture sur les différents sols montrent une capacité d'accumulation variable chez ces 4 espèces (Figure III.13). Les teneurs en As mesurées dans les racines des différentes espèces cultivées sur le sol AT ($[As]_{\text{totale}} = 233,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ de sol) ne montrent pas de différences significatives, les plantes ont accumulé environ 36 mg.kg^{-1} MS d'As dans leur partie racinaire (Figure III.13a). Au contraire, sur le même sol de culture, les teneurs mesurées dans les feuilles varient entre les espèces ce qui semble indiquer une variabilité dans les mécanismes de détoxification et de stockage de l'As chez ces espèces. D'autre part, contrairement aux autres espèces végétales qui stockent l'As essentiellement dans les racines, *C. sativa* présente des teneurs en As similaires entre les racines et les feuilles, respectivement $34,2$ et $36,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ MS d'As.

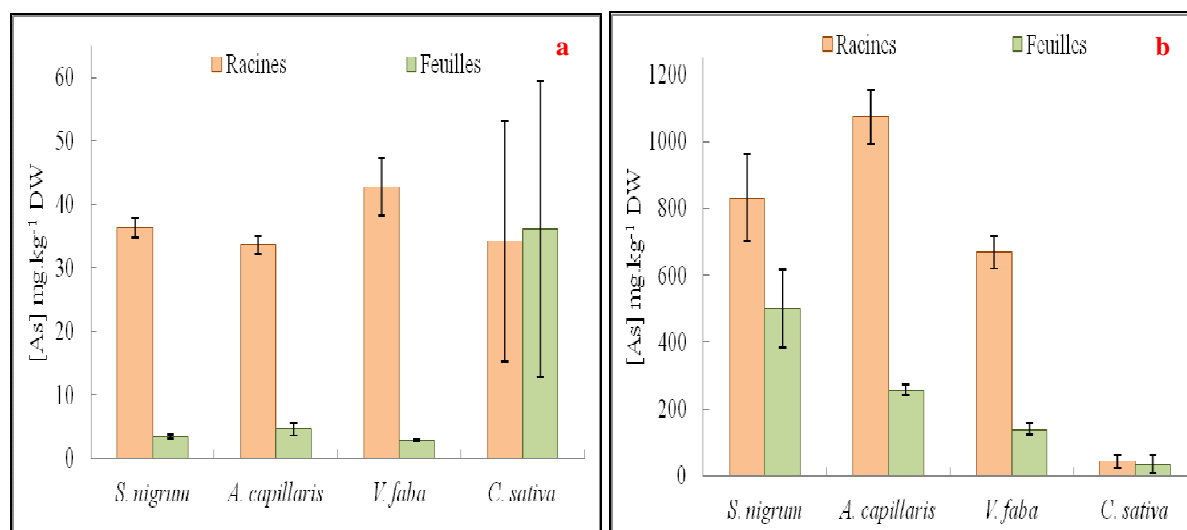


Figure III.13 : Teneur en As (mg.kg^{-1} MS) dans les feuilles et les racines de *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa* cultivées sur les sols AT (a) et AP (b) (n = 4).

Sur le sol AP ($[As] = 3163,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ de sol), *S. nigrum*, *A. capillaris* et *V. faba* concentrent plus de 20 fois plus d'As dans leur organes par rapport aux individus cultivés sur le sol AT (Figure III.13b). *S. nigrum* et *A. capillaris* présentent une capacité d'assimilation de l'As significativement plus importante (respectivement $603,1$ et $653,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ MS en moyenne dans la plante) que pour *V. faba* ($403,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ MS). Ces teneurs en As dans les plantes représentent $0,06 \%$ de leur matière sèche pour ces deux espèces et est inférieure à $0,05 \%$ de MS pour *V. faba*. D'autre part, comme sur le sol AT, *A. capillaris*, *V. faba* et *S. nigrum* cultivées sur le sol AP présentent des concentrations en As significativement plus

importantes dans les racines par rapport à celles mesurées dans les feuilles. Contrairement à ces espèces, les plants de *C. sativa* cultivés sur le sol AP présentent une faible teneur en As répartie entre les parties aériennes et racinaires et à peine deux fois supérieure à celle mesurée sur le sol AT.

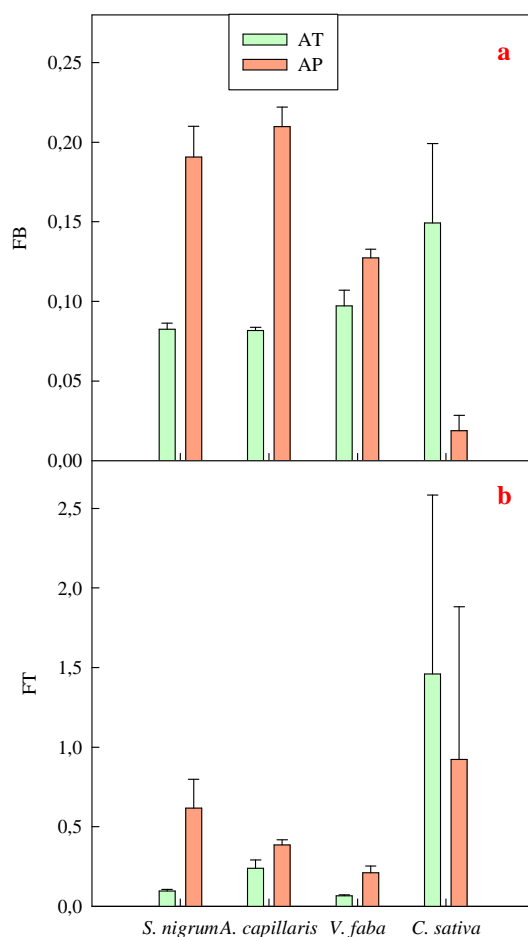


Figure III.14 : Facteurs de bioaccumulation (FB) (a) et de translocation (FT) (b) de l'As chez *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa* cultivées sur le sol Auzon Témoin (AT) et Pollué (AP) (n = 4).

Le FB est inférieur à 1 pour l'ensemble des plantes cultivées sur les 2 types de sol (Figure III.14a). Ces observations indiquent une faible capacité d'accumulation des 4 espèces. Cependant, les FB de *A. capillaris*, *V. faba* et *S. nigrum* présentent des valeurs significativement plus élevées chez les individus cultivés sur le sol AP que sur le sol AT. Pour ces espèces, l'absorption d'As est proportionnelle aux concentrations totales relevées dans le sol, celles-ci étant elles-mêmes corrélées aux teneurs biodisponibles de l'As dans le sol (Partie I, Chap III). Pour *C. sativa*, le phénomène est inversé, le FB est plus élevé sur le sol AT que

sur le sol AP, respectivement 0,14 contre 0,02. Cette observation couplée à la répartition homogène de l'As au sein de la plante, et aux faibles teneurs en As mesurées dans la plante semblent confirmer une stratégie d'exclusion de l'As retenue par cette espèce pour tolérer et se maintenir en présence d'As dans le sol.

Le Facteur de Translocation (FT) pour les espèces cultivées sur les sols AT et AP montre que la translocation de l'As vers les parties aériennes augmente significativement avec les teneurs en As dans le sol pour *A. capillaris*, *V. faba* et *S. nigrum* (Figure III.14b). Le FT est deux fois plus important pour *V. faba* et *A. capillaris* sur le sol AP que sur le sol AT, il est multiplié par six pour *S. nigrum*. Cependant, pour ces trois espèces le FT calculé est faible et inférieur à 1 quel que soit le sol de culture, l'As est donc préférentiellement stocké dans les racines. Pour *C. sativa*, la répartition de l'As au sein de la plante est différente que celle décrite précédemment. En effet, sur les 2 sols de culture, cette espèce a assimilé de faibles quantités d'As réparties de façon homogène dans les organes de la plante, matérialisées par un FT proche de 1 et sensiblement similaire entre les 2 conditions de culture.

Les 4 espèces végétales ont absorbé une partie de l'As présent dans les sols de culture et peuvent donc être responsables d'une modification de la disponibilité de ce métalloïde dans le sol rhizosphérique. Afin d'évaluer l'influence des plantes sur la répartition de l'As sur les différentes phases du sol rhizosphérique, des extractions séquentielles sélectives ont été réalisées sur les différents sols de culture.

2.2. Influence de la culture de plantes sur la disponibilité de l'arsenic dans le sol rhizosphérique

L'extraction séquentielle réalisée sur les sols AT et AP avant et après la culture permet d'observer l'impact de la culture de *A. capillaris*, *V. faba* et *S. nigrum* sur la distribution de l'As dans les différentes fractions du sol (Figure III.15). Dans le sol AT, seul l'As présent dans la fraction R_1 diminue après la culture des 3 espèces végétales, *S. nigrum*, *A. capillaris* et *V. faba*, respectivement de 55, 66 et 60 % (Figure III.15a). Sur le sol AP, seule *S. nigrum* a entraîné une réduction significative, d'environ 25 %, de la teneur en As dans la fraction échangeable et acido-soluble (R_1) par rapport aux teneurs en As observées dans la fraction R_1 avant la culture (Figure III.15b). D'autre part, une diminution significative de l'As est observée dans la fraction oxydable (R_3) à la suite de la culture de *S. nigrum* et *V. faba*, elle est respectivement de 36 et de 27 %.

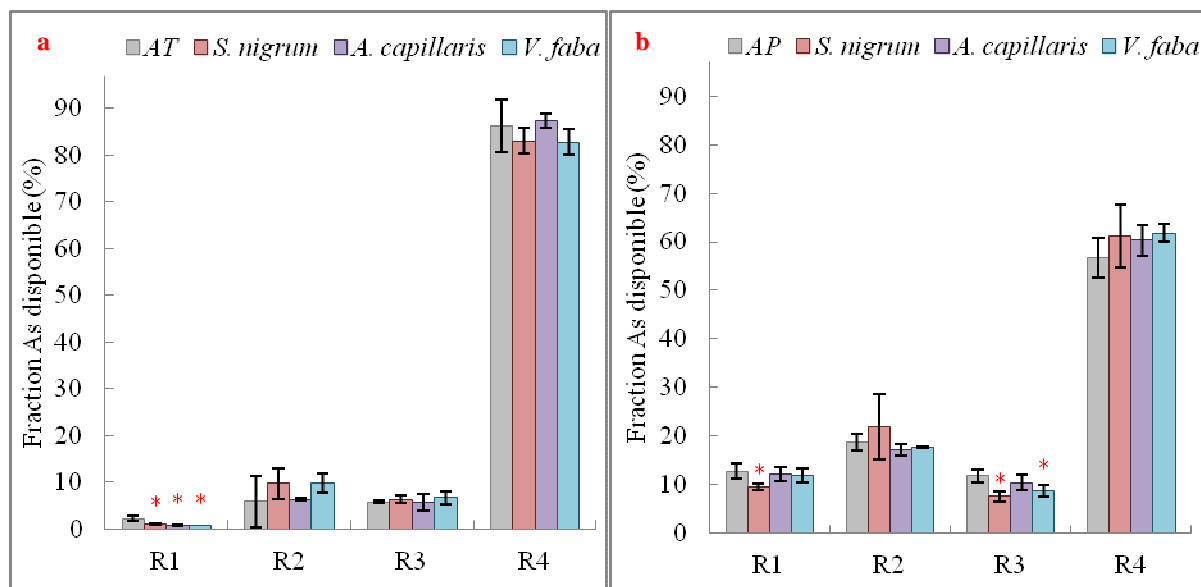


Figure III.15 : Pourcentage d'As dans les différentes fractions du sol d'Auzon Témoin (AT) et (a) et Pollué (AP) (b) avant et après la culture de *A. capillaris*, *S. nigrum* et *V. faba*. R₁ : fraction échangeable et acido-soluble de l'As, R₂ : As associé au Fe et Mn, R₃ : fraction oxydable de l'As et R₄ : fraction résiduelle de l'As (n = 4, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, p < 0,05).

3. Discussion

3.1. Impact physiologique de la pollution aux ETM sur les différentes espèces végétales

Cette étude a permis d'évaluer le comportement des quatre espèces végétales, *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa*, en présence d'une pollution importante en ETM. Pour les quatre espèces, l'accumulation de l'As est accompagnée par une inhibition de la production de biomasse, en particulier chez *V. faba* et *C. sativa*, et dans une moindre mesure chez *A. capillaris*. Cette inhibition de la croissance des plantes sur des sols pollués en ETM, et notamment à l'As, a déjà été rapportée par Tripathi *et al.* (2007). Dans notre étude, il apparaît que, pour toutes les espèces végétales, la pollution des sols a un effet inhibiteur plus important sur le développement de la biomasse racinaire que sur la croissance des parties aériennes (Figure III.7). Cette observation indique une toxicité des ETM plus élevée dans les tissus racinaires, caractéristique confirmée par les travaux de Prasad et Hagemeyer (1999). En effet, il rapporte qu'en présence de polluants métalliques, la croissance des racines est fortement inhibée du fait de leur contact direct avec les polluants du sol qui rend les tissus plus sensibles

à la pollution. Par ailleurs, cette inhibition de croissance peut être causée par une carence en phosphore (Desnos, 2008 ; Lou *et al.*, 2010), un élément essentiel dans la croissance racinaire et qui intervient dans les mécanismes d'élongation cellulaire (Reymond *et al.*, 2006) et dans l'activité du méristème (Jain *et al.*, 2007). En effet, l'arséniate (forme de l'As majoritaire dans le sol AP) agit comme un analogue du phosphate et est transporté à travers la membrane plasmique *via* les transporteurs racinaires du phosphate (Arnetoli *et al.*, 2008). Il peut donc par sa présence entraîner une carence en phosphate dans la plante. D'autre part, le phosphore est un élément essentiel dans le processus de la photosynthèse et dans la régulation de la synthèse des protéines, sa carence ou sa substitution par l'As au niveau des mécanismes cellulaires peut donc entraîner des perturbations physiologiques importantes (Milivojević *et al.*, 2006, Tripathi *et al.*, 2007).

Différents paramètres permettent d'évaluer l'activité photosynthétique des plantes et ainsi déterminer l'impact des ETM au niveau physiologique. Le Tableau III.8 met en évidence les variations significatives de différents paramètres physiologiques des plantes cultivées sur les sols AT et AP par rapport aux conditions contrôles.

Le fonctionnement des systèmes photosynthétiques ainsi que le stress oxydatif d'une plante apparenté à la pollution peuvent être détecté par la mesure de l'émission de fluorescence de la chlorophylle *a*. Trois espèces, *A. capillaris*, *V. faba* et *C. sativa*, cultivées sur le sol contaminé (AP), présentent une diminution significative des teneurs en chlorophylles *a* et *b* dans les feuilles accompagnée d'une inhibition significative du rendement quantique de la réaction photochimique (F_v/F_m). Ceci implique une réduction de l'efficacité du PSII à utiliser la lumière pour la conversion photochimique et par conséquent sa capacité à réduire l'accepteur primaire Q_A . De même, pour *V. faba* et dans une moindre mesure pour *A. capillaris*, une diminution significative de l'efficacité photochimique effective des PSII (Φ_{PSII}) est mesurée sur des individus cultivés sur le sol AP, caractérisant une baisse de la quantité d'énergie absorbée par la chlorophylle *a* associée au PSII. La réduction de ces variables peut être attribuée à une altération du transfert d'énergie à partir des antennes collectrices des PSII vers les centres réactionnels, mais aussi à l'impact direct des ETM sur ces centres réactionnels (Vaillant, 2003). Cependant, la réduction de Φ_{PSII} pourrait être consécutive à la dissipation de la lumière en excès sous forme de chaleur permettant la protection de la plante contre les dommages induits par un excès de lumière (Maxwell et Johnson, 2000).

Tableau III.8 : Impact de la pollution des sols en ETM sur les paramètres physiologiques de *S. nigrum*, *A. capillaris*, *V. faba*, et *C. sativa*, résultats du test ANOVA avec les différences significatives (n = 8, *, **, ***, F-test significatif à $P \leq 0,05$, 0,01 et 0,001, respectivement) et non significatives (NS) par rapport aux conditions contrôles.

	<i>S. nigrum</i>		<i>A. capillaris</i>		<i>V. faba</i>		<i>C. sativa</i>	
	AT	AP	AT	AP	AT	AP	AT	AP
Pn	NS	***	NS	***	*	***	NS	*
gs	NS	***	NS	***	***	***	NS	*
Ci	NS	***	NS	***	NS	***	NS	NS
T	NS	***	NS	***	*	***	NS	NS
ΦPSII	NS	NS	NS	**	NS	***	NS	NS
F_v/F_m	NS	NS	NS	**	NS	***	NS	**
Chl <i>a</i>	NS	NS	NS	*	***	***	NS	***
Chl <i>b</i>	NS	**	NS	***	***	***	NS	**

L'étude de la fluorescence de la chlorophylle *a* met ainsi en évidence un impact des ETM sur le fonctionnement des PSII, notamment chez *V. faba* et *A. capillaris*, traduit par des dommages structuraux des photosystèmes et, dans certains cas, par de la photoinhibition (Damour, 2008). Les ETM affectent, d'une part, la capacité des PSII à capter l'énergie lumineuse au niveau des antennes collectrices en inhibant les voies de biosynthèse des chlorophylles et le transfert de l'énergie d'excitation vers les centres réactionnels. D'autre part, ils altèrent l'efficacité photochimique des PSII en ayant un impact direct sur la structure des centres réactionnels.

Ces dommages conduisent à une altération du transport des électrons dans la réaction photochimique de la photosynthèse et donc à une diminution de l'activité photosynthétique. En effet, l'étude des échanges gazeux a montré, pour les quatre espèces végétales cultivées sur le sol AP, une diminution de plus de 50 % du taux de photosynthèse nette (Pn) accompagnée d'une inhibition de la conductance stomatique (gs). La diminution du taux de Pn n'est pas due à une carence en CO₂ disponible pour la plante car sa concentration dans les feuilles (Ci) augmente significativement en réponse au stress à l'As chez *A. capillaris*, *V. faba* et *S. nigrum*. L'accumulation de CO₂ dans les espaces intracellulaires des stomates et la diminution

de la conductance stomatique indiquent que la réduction de l'activité photosynthétique dans les plantes cultivées sur le sol AP est due à une double action des ETM : l'altération de la conductance stomatique entraînant une diminution de l'absorption de CO₂ et l'inhibition de l'activité carboxylase de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase (Ahsan *et al.*, 2010 ; Dhir *et al.*, 2011). En effet, la présence de quantité importante de CO₂ dans les stomates des feuilles de ces plantes semble indiquer une augmentation de l'activité oxygénase de la Rubisco au détriment de son flux photosynthétique de carboxylation (Petit *et al.*, 2008). L'absence de variation des concentrations intercellulaires en CO₂ chez *C. sativa* malgré une diminution significative de la conductance stomatique suggère que l'activité carboxylase de la Rubisco est légèrement inhibée, entraînant une perturbation dans l'assimilation nette du CO₂ par la plante (Pn).

La perturbation de l'activité photosynthétique est donc la conséquence d'une diminution des produits issus de la photoconversion suite à l'altération du fonctionnement du PSII et à l'inhibition de l'activité carboxylase de la Rubisco. Par ailleurs, l'impact de la pollution sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique altère le métabolisme des glucides qui affecte la croissance des plantes mise en évidence précédemment (Schurr *et al.*, 2006).

3.2. Transfert et stockage de l'As

Pour les quatre espèces étudiées, la teneur en As dans les tissus de la plante est inférieure à 0,1 % de matière sèche. Selon les travaux de Zhao *et al.* (2009), les plantes hyperaccumulatrices de l'As accumulent de 0,1 % jusqu'à environ 2 % d'As dans la biomasse aérienne avec un FT de l'As supérieur à 1. Entre l'hyperaccumulation et le mécanisme d'exclusion, il existe des espèces végétales ayant des capacités intermédiaires dans l'accumulation de l'As. C'est le cas de *S. nigrum*, qui a un FB égal à 0,2 et un FT de 0,6 sur le sol AP. Cette plante est capable d'accumuler l'As et stocke la majorité dans les parties aériennes (Figure III.16). Toutefois, la capacité d'extraction de *S. nigrum*, *A. capillaris* et *V. faba* augmente significativement avec les concentrations de l'As dans le sol. En effet, l'accumulation et la translocation de l'As dans les plantes sont influencées par de nombreux facteurs comme la nature de l'espèce végétale, la teneur totale et la disponibilité de l'As dans le sol, le pH et la structure du sol ainsi que le contenu des autres éléments minéraux considérés comme essentiels dans le sol (Verbruggen *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2010). Pour ces 3 espèces végétales, une majorité de l'As absorbé est stockée dans les racines (FT < 1).

Ces résultats confirment l'hypothèse que les racines de certaines plantes supérieures peuvent jouer le rôle d'organe piège dans la translocation de l'As vers les parties aériennes (Baroni *et al.*, 2004). Matschullat (2000) a rapporté que l'un des mécanismes de tolérance à l'As est l'accumulation de cet élément dans les racines et un faible transfert vers les parties aériennes. Ce mécanisme permet de limiter les effets néfastes de l'As sur l'organisation et le fonctionnement des systèmes photosynthétiques des feuilles et la formation de radicaux libres. Parallèlement, *C. sativa* absorbe de très faibles quantités d'As, la teneur totale moyenne en As dans la plante s'élève à 35,2 et 58,9 mg.kg⁻¹ de MS pour des plantes cultivées respectivement sur le sol AT et AP et le FB est inférieur à 0,02 sur le sol AP. Cependant, le FT est supérieur à 1 dans les deux conditions, il est de 1,5 pour des individus cultivés sur le sol AT et atteint 2,4 sur le sol AP. Toutes ces caractéristiques permettent d'avancer que *C. sativa* met en place un mécanisme d'exclusion de l'As au niveau du système racinaire limitant son absorption et par conséquent sa phytotoxicité. Ce mécanisme permettrait ainsi à cette espèce de se développer sur des sols contaminés à l'As.

Le calcul des stocks présenté dans la Figure III.16 permet de déterminer la répartition de l'As au sein des tissus végétaux ainsi que les quantités d'As prélevées par les différentes espèces végétales. L'analyse montre que pour des plantes à faible biomasse telles que *A. capillaris*, seules de faibles quantités d'As sont absorbées (130 µg d'As pour des individus cultivés sur le sol AP) et qu'une grande majorité, environ 80 %, est stockée dans les tissus racinaires. Au contraire, pour des plantes à fortes biomasses, la capacité de stockage des plantes augmente considérablement, comme pour *S. nigrum* qui accumule des concentrations comparables à celles mesurées chez *A. capillaris* mais dont la forte biomasse permet d'augmenter les quantités absorbées. De plus, *S. nigrum* stocke principalement l'As (≈ 87 % de l'As) dans ses parties aériennes. Or, sa faible sensibilité aux ETM, exprimée lors de l'étude de la réponse physiologique de la plante au stress métallique, semble indiquer une détoxification de l'As dans les tissus de la plante, *via* sa complexation avec des ligands organiques tels que les métallothionéines (MT, Goupil *et al.*, 2009) ou les phytochélatines (PC, Briat, 2010). La complexation avec des PC permettrait sa translocation vers les parties aériennes et sa séquestration dans les vacuoles (Zhao *et al.*, 2009) et expliquerait ainsi le phénomène de tolérance à l'As observé chez cette espèce. Sur le sol AP, les individus de *V. faba*, espèce sensible aux ETM, ont chacun accumulé en moyenne 538,4 µg d'As avec une répartition homogène entre les racines et les feuilles. De fait, cette accumulation de l'As en absence de mécanisme de détoxification au sein de la plante peut-être responsable d'une importante toxicité de l'As vis-à-vis de cette espèce et ainsi entraîner une forte inhibition de

son activité physiologique. Concernant *C. sativa*, le calcul des stocks confirme, malgré une forte biomasse aérienne, une faible absorption de l'As ($37,7 \mu\text{g}$ d'As sur le sol AP). Celle-ci peut être la conséquence soit d'un processus d'exclusion au niveau racinaire soit d'une toxicité importante du sol sur le système racinaire limitant ainsi l'absorption de polluants ainsi que celle de nutriments responsable, par ailleurs, d'une réduction de croissance (Vernay *et al.*, 2007). De plus, une majorité de l'As absorbé est transférée vers les parties aériennes, environ 96 %, accentuant les perturbations du système photosynthétique observées.

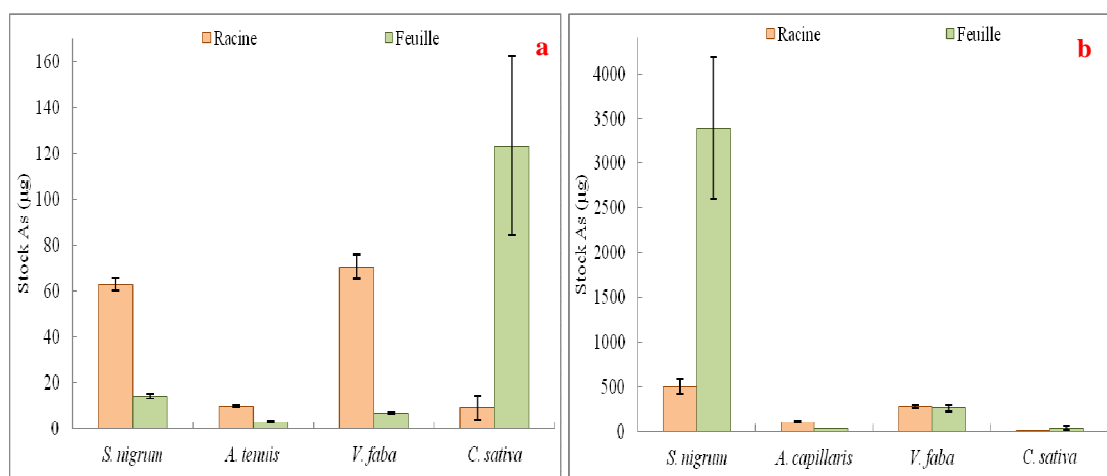


Figure III.16 : Calcul des stocks en As dans les tissus des plantes après leur culture sur le sol Auzon Témoin (AT) (a) et Pollué (AP) (b) (n = 4).

3.3. Influence des cultures sur la distribution de l'As dans le sol

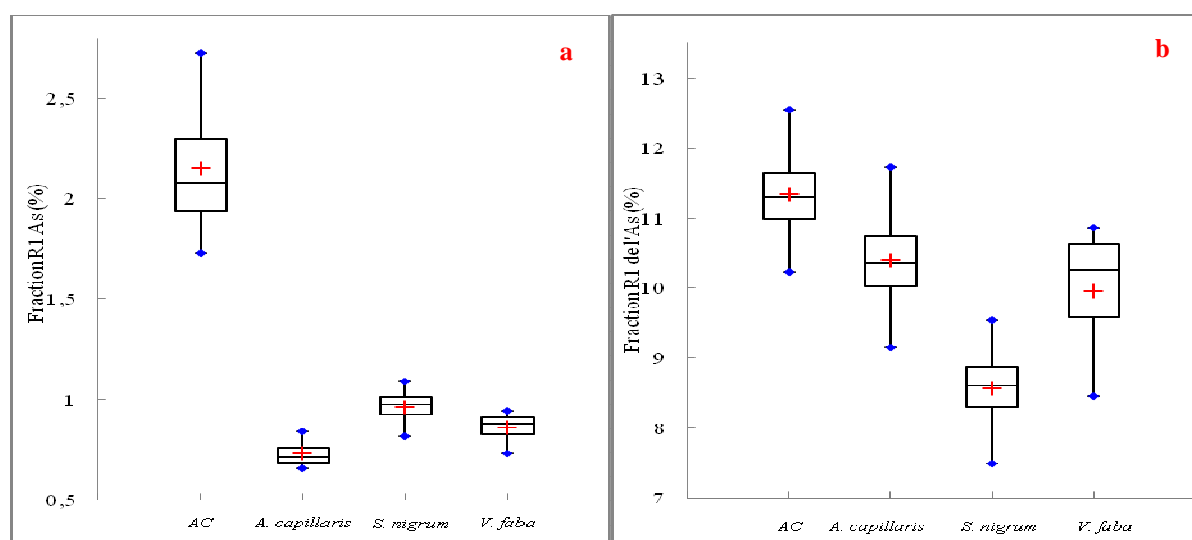


Figure III.17 : Fraction R_1 de l'As (%) avant culture (AC) et après la culture des 3 espèces végétales, *A. capillaris*, *S. nigrum* et *V. faba* sur le sol AT (a) et AP (b) (n = 4).

Les extractions séquentielles réalisées avant et après culture des plantes ont permis d'évaluer l'impact de celles-ci sur le fractionnement de l'As dans le sol et plus particulièrement sur la fraction échangeable et acido-soluble de l'As considérée comme la plus mobile (Figure III.17). Sur le sol AT, la fraction R_1 de l'As dans la rhizosphère varie de façon significative pour les 3 espèces végétales. Cette fraction de l'As peut être considérée comme la teneur en As biodisponible dans les sols (Fayiga *et al.*, 2007), et donc facilement assimilable par les plantes. Sur sol contaminé (AP), une diminution significative de la fraction R_1 dans le sol rhizosphérique est observée après la culture de *S. nigrum*. Cette espèce montre une corrélation forte ($R^2 = 0,876$, Figure III.18a) entre la quantité d'As absorbé par la plante et la diminution de l'As dans la fraction R_1 . *S. nigrum* a donc absorbé une partie de l'As disponible présent dans le sol et permet ainsi de limiter son transfert dans les écosystèmes voisins. *A. capillaris* qui, de par sa faible biomasse, absorbe des quantités limitées, ne permet pas de diminuer significativement la fraction disponible de l'As. Au contraire, *V. faba* présente des quantités d'As comparable à celles mesurées chez *S. nigrum*, l'As absorbé peut provenir de la fraction oxydable qui diminue significativement suite à la culture de *V. faba*. Cette fraction R_3 englobe les formes arsénisées liées à la matière organique et aux sulfures qui ont pu être libérées suite à l'oxydation du milieu par modification du potentiel d'oxydoréduction. Cette libération peut aussi être causée par l'oxydation des sulfures par des bactéries telles que les Thiobacilles (Benzaazoua *et al.*, 2002).

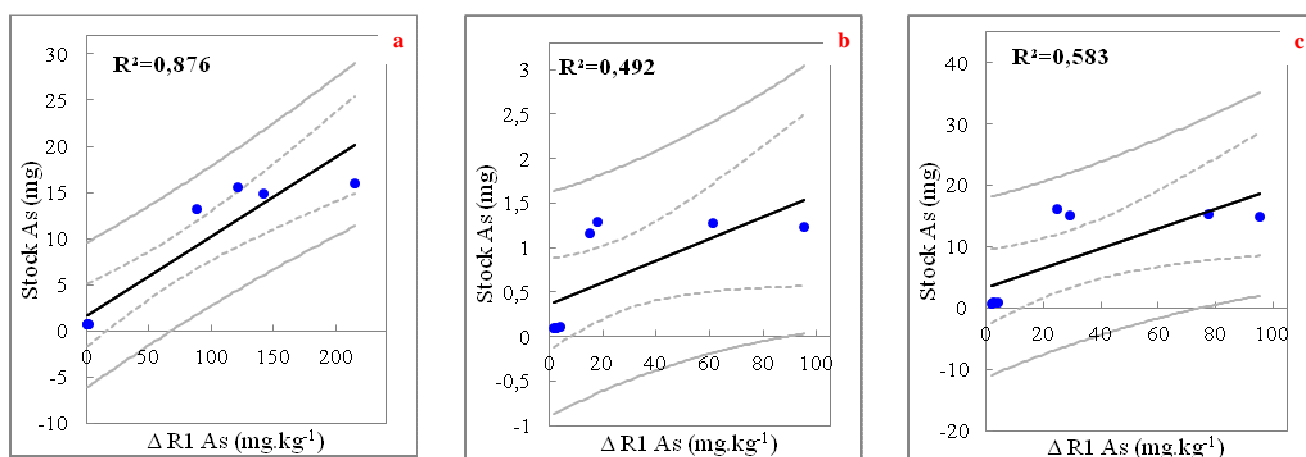


Figure III.18 : Régressions linéaires entre la quantité d'As contenu dans la plante et les teneurs de la fraction échangeable et acido-soluble de l'As pour (a) *S. nigrum*, (b) *A. capillaris* et (c) *V. faba*.

La réduction de la fraction R_1 de l'As dans le sol rhizosphérique peut être la conséquence de deux phénomènes couplés, d'une part l'absorption de l'As par la plante et d'autre part l'effet de la modification des propriétés physico-chimiques du sol sur le fractionnement de l'As (Xu *et al.*, 2010). En effet, plusieurs facteurs influencent la spéciation de l'As dans le sol rhizosphérique, on peut citer notamment le pH, la CEC, le contenu en matière organique, l'activité de la microflore et la nature des exsudats racinaires des plantes (Fitz et Wenzel, 2002 ; Xu *et al.*, 2010). Ces exsudats peuvent modifier d'une part les paramètres physico-chimiques du sol (pH, DOC) (Gonzaga *et al.*, 2009) jouant un rôle dans la répartition de l'As au niveau des différentes phases porteuses du sol (Alam *et al.*, 2003). D'autre part, ils peuvent modifier la composition chimique de l'interface sol-racine entraînant des phénomènes de précipitation, favorisant l'immobilisation de l'As et diminuant ainsi sa phytotoxicité (Fitz et Wenzel, 2002). L'As en solution dans le sol peut donc être absorbé par les plantes, adsorbé aux particules du sol ou précipité après la libération de composés par le système racinaire (molécules organiques, acides aminés, des sucres et des composés phénoliques).

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence le comportement de différentes espèces végétales vis-à-vis d'une pollution polymétallique. Les différents résultats montrent que les concentrations élevées en ETM dans le sol ont un impact physiologique sur ces quatre espèces végétales. L'étude de leur comportement a permis de mettre en lumière la capacité de tolérance de *S. nigrum* à une pollution polymétallique caractérisée par sa présence et son développement sur des sols contaminés sans développement de symptômes de dessèchement ou de nécrose des tissus foliaires. Les mesures de certains paramètres physiologiques montrent une variation de l'activité photosynthétique, sans impact significatif sur la croissance de la biomasse aérienne. *A. capillaris*, régulièrement citée comme espèce tolérante ou hyperaccumulatrice d'As (Cai et Ma, 2003 ; Gonzaga *et al.*, 2006), montre une inhibition significative de son développement et de son activité physiologique au cours de sa culture sur le sol pollué (AP). Cependant, la dominance de cette espèce sur le site contaminé de la Vieille Usine d'Auzon, indique une capacité de tolérance et d'adaptation d'*A. capillaris* aux fortes teneurs en ETM. Cette différence de comportement suggère que les graines d'*A. capillaris* utilisées lors de cette expérience sont des écotypes non résistants aux ETM présents dans le sol. Le choix de tester le comportement d'*A. capillaris*, dont les graines n'ont pas été prélevées sur le site industriel d'Auzon, a été effectué afin de pouvoir étudier la possibilité d'utiliser des graines d'un écotype non métallicole de cette espèce plus facilement accessible dans le

commerce. L'objectif est de pouvoir faciliter et généraliser l'utilisation de cette espèce dans des programmes de phytostabilisation. Cependant, les perturbations physiologiques mesurées sur sol pollué semblent indiquer une adaptation locale à la contamination du sol des écotypes métallicoles qui limite l'utilisation d'écotype non métallicole de cette espèce dans des procédés de phytostabilisation. Par ailleurs, *V. faba* présente une forte perturbation de son activité physiologique responsable d'une inhibition de son développement en présence d'ETM. Cette espèce, qui ne semble pas développer de mécanismes de détoxification, peut être considérée comme une espèce sensible et non métalphyte. Pour *C. sativa*, la stratégie d'exclusion de l'As au niveau racinaire a permis de limiter l'accumulation de l'As au sein des organes de la plante. Ainsi, cette espèce a pu se développer sur des sols contaminés, avec des effets modérés des ETM sur la croissance et l'activité physiologique. Cette stratégie peut permettre d'envisager la revalorisation de la biomasse aérienne (fibres végétales utilisées dans les matériaux d'isolation, bioénergie) à la suite de son utilisation dans des protocoles de phytostabilisation. Cependant, le sol de l'usine d'Auzon (AP) est un environnement de faibles qualités agronomiques (pH acide, rapport C/N faible) comme de nombreux sols pollués (Tordoff *et al.*, 2000), pouvant être responsable d'une inhibition de la croissance de la plante sur le sol pollué (AP).

Chapitre III : Expérimentation in-situ d'un procédé de phytostabilisation

Les différentes expérimentations réalisées au laboratoire au cours de ce travail ont permis l'acquisition de connaissances sur les effets induits au niveau physiologique et biochimique des éléments traces métalliques et métalloïdes chez différents modèles végétaux. L'objectif est d'utiliser ces connaissances pour mettre en place un procédé de phytostabilisation aidé *in-situ*, sur le site industriel d'Auzon fortement contaminé aux éléments traces métalliques et métalloïdes.

Le site industriel de la Vieille Usine d'Auzon retenu pour ce projet de phytostabilisation présente, par son histoire industrielle, sa localisation dans le parc naturel du Livradois-Forez et ses caractéristiques intrinsèques, des enjeux environnementaux et sociétaux similaires à de nombreux sites industriels. De fait, l'utilisation d'un procédé de phytostabilisation pour la revalorisation de ce site industriel à plusieurs avantages :

- Permettre le développement d'un couvert végétal dense facilitant l'immobilisation des polluants dans le sol rhizosphérique et favorisant la réintégration paysagère du site ;
- Limiter le transfert des polluants vers les milieux voisins, la végétation ou la faune du sol.

Cette étude se concentre à observer l'impact de la nature du matériel végétal et de la nature des amendements sur l'évolution des teneurs et de la spéciation des polluants métalliques et métalloïdes dans le sol. Le développement et la diversité du couvert végétal seront déterminés pour évaluer la revégétalisation du site pollué et apprécier le bénéfice des amendements. L'étude s'est portée sur les différents ETM rencontrés en excès dans le sol du site industriel de la Vieille Usine d'Auzon (Partie III, Chap I.1).



Figure III.19 : Photo des parcelles de chanvre cultivé après deux mois de culture, à gauche : parcelle de chanvre sur le site pollué (AP) avec apport de NPK et de grenaille de fer ; à droite : parcelle de chanvre sur le site de référence (AT).

La culture de *Cannabis sativa* en champs n'a pu être exploitée. En effet, un vol de la totalité des plants a été commis sur le site d'étude, entre le 17/08/2010 et le 26/08/2010, soit quelques jours avant la récolte. La Figure III.19 présente des photos du chanvre cultivé sur le site pollué (AP) et sur le site référence (AT) prises après deux mois de culture. Elle met en évidence un développement des plants de chanvre sur le site pollué, principalement sur les parcelles enrichies en fer. Les mesures de la fluorescence de la chlorophylle *a* des plants de

chanvre cultivés sur les parcelles expérimentales mises en place sur le site d'Auzon (résultats non présentés dans ce rapport) montrent une variation de F_v/F_m comprise entre 0,77 et 0,81 pour l'ensemble des conditions testées. Celles-ci confirment la capacité de cette espèce à tolérer la pollution aux ETM et à se développer sur site pollué. L'Annexe IV présente une copie de la déclaration de vol effectuée auprès de la gendarmerie de St Florine (43).

Tableau III.9 : Composition floristique de l'Association Végétale (AV) introduite sur la friche industrielle.

Poaceae 50 %	Fabaceae 30 %	Autres 20 %
<i>Agrostis capillaris</i> 20 %	<i>Onobrychis viciifolia</i> 10 %	<i>Achillea millefolium</i> 5 %
<i>Arrhenaterum elatius</i> 10 %	<i>Medicago lupulina</i> 10 %	<i>Euphorbia cyparissias</i> 5 %
<i>Dactylis glomerata</i> 10 %	<i>Lotus corniculatus</i> 5 %	<i>Plantago lanceolata</i> 5 %
<i>Holcus lanatus</i> 10 %	<i>Vicia faba</i> 5 %	<i>Silene latifolia</i> 5 %

Ainsi, seule l'influence de l'association végétale regroupant des plantes herbacées de prairies a été étudiée. Cette sélection regroupe principalement des espèces inféodées au site d'étude et des métalphytes reconnues. De plus, le choix de ces espèces a été réalisé en fonction de leur caractéristique. La sélection a donc favorisé, d'une part, la présence importante des Poacées, représentant 50 % de l'association végétale. Celles-ci permettent un recouvrement optimal du sol et présentent un système racinaire dense. D'autre part, la sélection a privilégié les Légumineuses, représentant 30 % de l'association végétal, pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique permettant, de ce fait, l'enrichissement du sol en azote. Enfin, l'aspect esthétique du couvert végétal a été pris en compte. Le Tableau III.9 présente les différentes espèces qui composent cette association végétale.

Un listing des conditions de cultures avec les abréviations correspondantes est détaillé dans le Tableau III.10.

Tableau III.10 : Présentation des abréviations des différentes conditions testées dans ce travail.

AT VN	Auzon Témoin Végétation Naturelle
AT AV	Auzon Témoin Association Végétale introduite
AP VN	Auzon Pollué Végétation Naturelle
AP AV	Auzon Pollué Association Végétale introduite
AP AV _(Fe)	Auzon Pollué Association Végétale introduite (ajout grenaille de fer 1 %)
AP AV _(MO)	Auzon Pollué Association Végétale introduite (matière organique 500 g/m ²)
AP AV _(Fe + MO)	Auzon Pollué Association Végétale introduite (grenaille de fer 1 % + matière organique 500 g/m ²)

1. Conditions climatiques pendant l'expérimentation

Aucune station météo n'étant présente sur la commune d'Auzon, les données météorologiques ont été relevées à partir de la station de Météo France de la commune de Fontannes (43) située à 15 km de la commune d'Auzon, à une altitude de 435 m (45°18'0 N, 3°25'1 E).

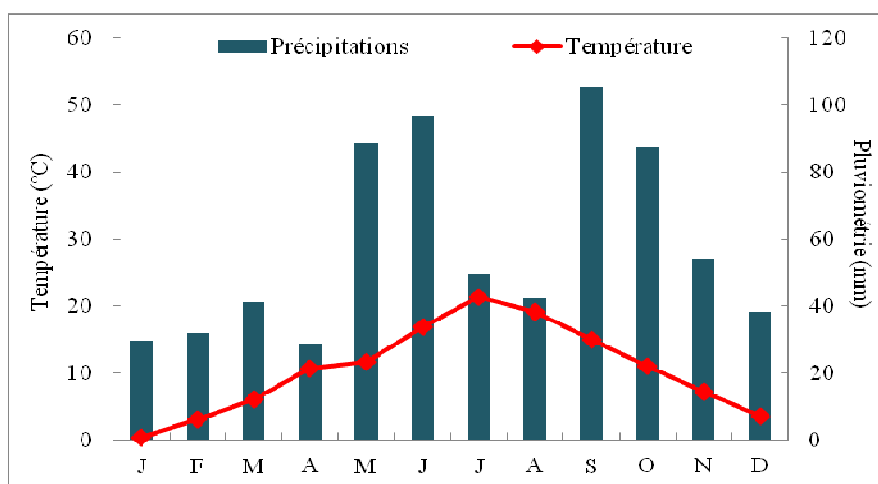


Figure III.20 : Diagramme ombrothermique de 2010 réalisé à partir des données météorologiques de la station de Fontannes.

La Figure III.20 représente le diagramme ombrothermique construit à partir des données météorologiques de la station Météo de Fontannes pour l'année 2010 lors de laquelle

s'est déroulée l'expérimentation. Le climat est de type continental avec des influences océaniques. Le cumul pluviométrique pour l'année 2010 est faible à modéré, il est estimé à 693,8 mm.an⁻¹. Les températures moyennes sont de + 0,3 °C en janvier et + 21,4 °C en juillet, l'hiver a donc été relativement froid et l'été au-dessus des normales saisonnières de ces 10 dernière années (la température moyenne du mois de janvier et de juillet sur les 10 dernières années étant respectivement de + 3,3 et + 19,8 °C).

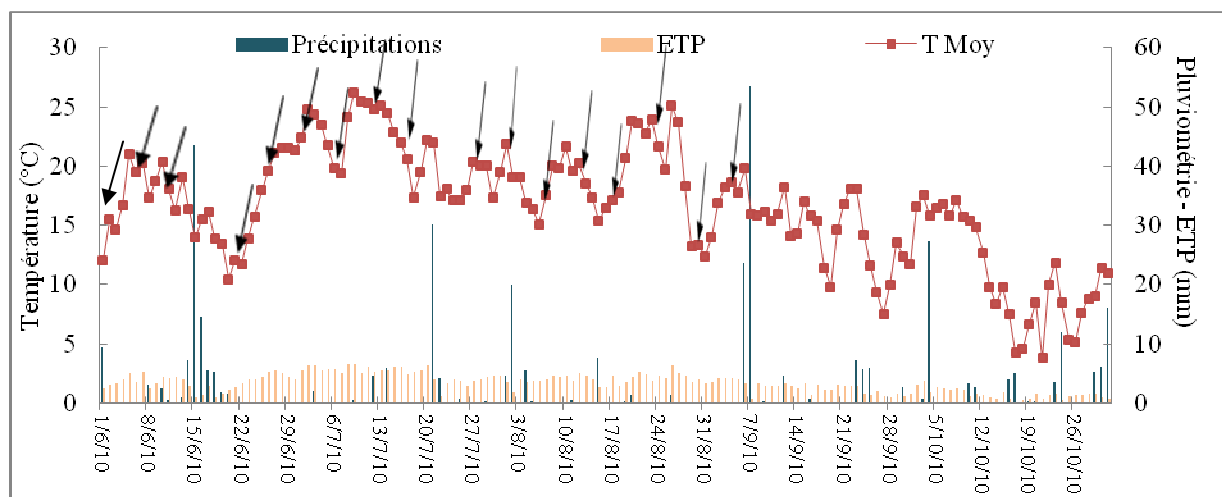


Figure III.21 : Diagramme climatique précisant les données quotidiennes de précipitation, évapotranspiration (ETP) et température pour l'ensemble de la période de l'expérimentation *in-situ* (de juin à octobre 2010). Les flèches noires correspondent aux apports en eau effectués sur l'ensemble des parcelles.

Un suivi quotidien de la pluviométrie, de l'évapotranspiration et de la température a été réalisé pendant toute l'année 2010. La Figure III.21 présente ces données pour toute la durée de l'expérimentation, du mois de juin au mois d'octobre 2010. Les données de pluviométrie et d'évapotranspiration ont permis de déterminer les apports en eau pour l'ensemble des cultures. Pour chaque parcelle de 10 m², l'apport en eau pendant la période estivale est indiqué sur la Figure III.21 et est évalué entre 10 et 30 L d'eau.

2. Propriétés physico-chimiques des sols

Pour évaluer l'influence des amendements (matière organique et/ou grenaille de fer) et de la végétation sur les propriétés du sol, un suivi de certains paramètres physico-chimiques (pH, CEC, teneur en phosphore soluble et en fer) a été réalisé sur les différentes parcelles.

2.1. Evolution du pH

L'évolution des valeurs du pH est présentée dans le Tableau III.11. Une variation de pH est observée en fonction du type d'amendements et du sol de culture. En effet, le pH du sol témoin (AT) est plus élevé que celui mesuré sur le sol pollué (AP) (pH respectivement de 6,2 contre 5,7). De même, l'apport de fer a entraîné une légère diminution du pH, d'environ 0,4 unité en présence de fer seulement et 0,9 unité en présence de fer et de matière organique par rapport à la condition sans apport (AP AV). Par ailleurs, après 3 mois de culture, le pH diminue légèrement dans la majorité des conditions excepté lorsque les deux apports (fer et matière organique) sont effectués sur la même parcelle où une augmentation de 0,1 unité de pH est observée. Ces légères fluctuations de pH au cours de la culture peuvent être la conséquence de l'activité des racines, notamment l'absorption des éléments minéraux et la libération d'exsudats racinaires par les plantes modifiant les paramètres physico-chimiques du sol (Fitz et Wenzel, 2002 ; Alam *et al.*, 2003).

Tableau III.11 : Valeur du pH avant et après culture pour les différentes conditions (n = 9).

	AT VN	AT AV	AP VN	AP AV	AP AV _(Fe)	AP AV _(MO)	AP AV _(Fe+MO)
Avant culture	6,20 ± 0,06	6,16 ± 0,11	5,71 ± 0,01	5,73 ± 0,05	5,31 ± 0,02	5,71 ± 0,06	4,88 ± 0,03
Après culture	5,83 ± 0,16	5,81 ± 0,09	5,10 ± 0,01	5,54 ± 0,04	5,30 ± 0,11	5,19 ± 0,06	5,01 ± 0,02

2.2. Evolution de la CEC

Les valeurs de CEC ont été mesurées pour évaluer l'impact d'une part des amendements et d'autre part de la culture des plantes. Les résultats (Tableau III.12) montrent une variation de la CEC en fonction des conditions de culture. En effet, les CEC mesurées sont faibles, la valeur minimale est mesurée sur le site pollué pour la condition AP VN (8 cmol⁺.kg⁻¹). La valeur de la CEC du sol témoin (AT) est plus élevée que la CEC du sol pollué sans apport (AP), ceci peut-être dû à une utilisation agricole du sol témoin sur le long terme (Jung *et al.*, 2002).

Tableau III.12 : Valeur de la CEC ($\text{cmol}^+.\text{kg}^{-1}$) avant et après culture pour les différentes conditions ($n = 9$).

	AT VN	AT AV	AP VN	AP AV	AP AV _(Fe)	AP AV _(MO)	AP AV _(Fe+MO)
Avant culture	$18,9 \pm 1,0$	$13,1 \pm 1,6$	$8,0 \pm 0,9$	$10,1 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,4$	$10,6 \pm 0,5$	$11,6 \pm 0,2$
Après culture	$18,8 \pm 0,8$	$18,5 \pm 0,7$	$9,6 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,3$	$12,8 \pm 0,3$	$12,2 \pm 0,4$	$11,6 \pm 0,2$

De plus, l'apport de grenaille de fer au sol (1 %) entraîne une augmentation de la CEC, elle est de $12,4$ et $11,6 \text{ cmol}^+.\text{kg}^{-1}$ respectivement pour les conditions AP AV_(Fe) et AP AV_(Fe+MO) contre $10,1 \text{ cmol}^+.\text{kg}^{-1}$ si aucun n'apport n'est effectué (AP AV). L'ajout de matière organique au sol sous forme de compost ne modifie pas significativement les valeurs de CEC. Par ailleurs, une variation avant et après culture est observée pour certaines conditions, en absence d'amendements (AT AV, AP VN et AP AV) et sur les parcelles enrichies en matière organique (AP AV_(MO)).

2.3. Teneur en phosphore dans le sol

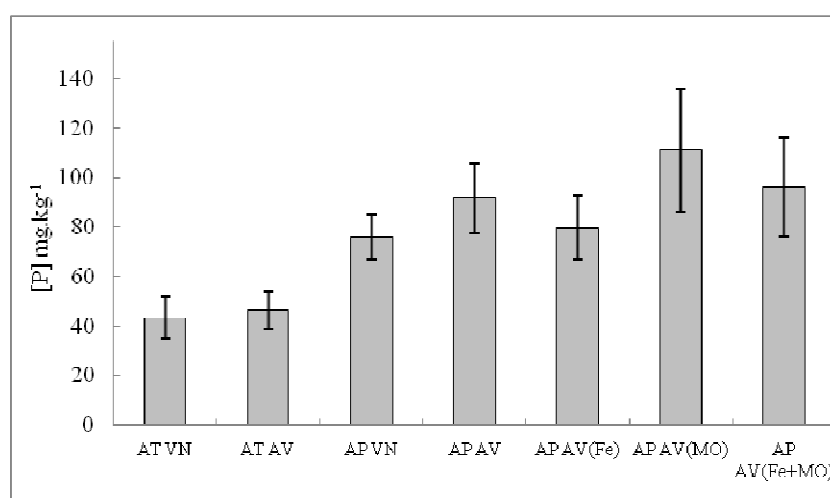


Figure III.22 : Teneur en phosphore soluble (mg.kg^{-1}) dans le sol en fonction des différentes conditions de cultures ($n = 9$).

L'étude des teneurs en phosphore (Figure III.22) en fonction des différentes conditions montre une teneur en phosphore plus faible sur le sol témoin (AT) que sur le sol pollué (AP). Les concentrations moyennes relevées pour chaque sol sont de $44,8$ contre $90,5 \text{ mg.kg}^{-1}$

respectivement pour le sol AT et AP. Les différents amendements appliqués sur les parcelles pollués n'entraînent pas de modification significative des teneurs en phosphore soluble dans le sol, une légère augmentation est cependant observée suite à l'ajout de matière organique.

2.4. Teneur en fer dans le sol

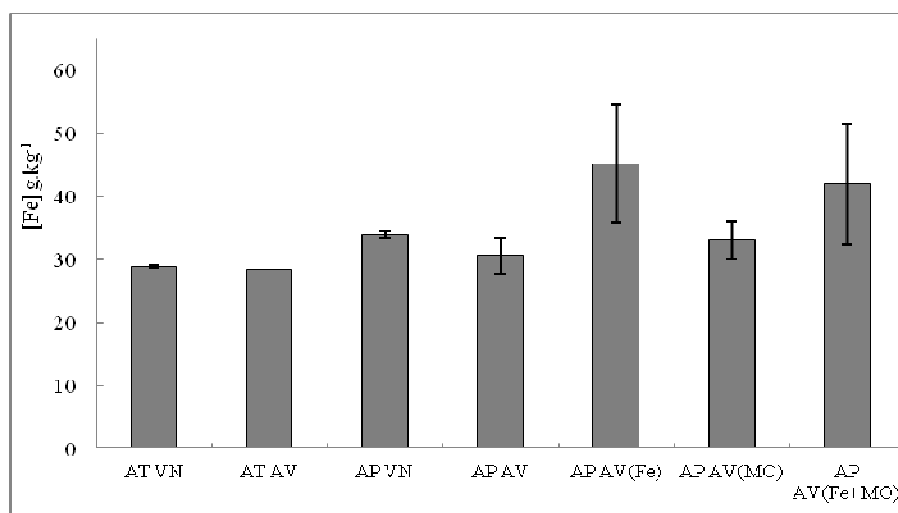


Figure III.23 : Teneur totale en fer (g.kg^{-1}) pour les différentes conditions de culture ($n = 9$).

En l'absence d'ajout de grenaille de fer (conditions AT VN, AT AV, AP VN, AP AV, AP AV_(MO)), la teneur en fer dans les sols AT et AP est proche de 30 g.kg^{-1} soit environ 3 % ($28,6$ et $32,5 \text{ g.kg}^{-1}$ respectivement pour le sol AT et AP) (Figure III.23). Les teneurs relevées dans les deux sols, témoin (AT) et pollué (AP), sont proches de la teneur moyenne en fer rencontrée dans la majorité des sols et qui est estimée à 35 g.kg^{-1} (Bréchignac et Deville-Cavelin, 2002). L'apport de grenaille de fer a permis d'augmenter la teneur en fer dans le sol d'environ 1 % correspondant à la quantité ajoutée. Les teneurs mesurées sont de $44,6$ et $42,5 \text{ g.kg}^{-1}$ de fer respectivement dans les conditions AP AV_(Fe) et AP AV_(Fe+MO).

3. Evaluation d'un point de vue qualitatif et quantitatif du couvert végétal

3.1. Etude de la diversité végétale

Pour évaluer la diversité végétale dans chaque parcelle, trois relevés floristiques ont été réalisés sur des surfaces de 1 m² déterminées aléatoirement. L'ensemble des résultats sont présentés dans le Tableau III.13. Un relevé floristique détaillé de chaque parcelle est présenté dans l'Annexe V.

Tableau III.13 : Nombre d'espèces par m² et nombre d'espèces introduites relevées dans chaque parcelle et pour chaque condition de culture (n = 9), les espèces surlignées en vert sont des espèces introduites majoritaires (espèces AV).

	Nombre d'espèces/m ²	Espèces AV	Espèces dominantes (A)		
AV	12		<i>A. capillaris</i> 2,0	<i>A. elatius</i> 2,0	<i>O. viciifolia</i> 2,0
AT VN	7,3 ± 1,2	2,3 ± 0,6	<i>A. retroflexus</i> 2,3	<i>R. fruticosus</i> 2,3	<i>E. repens</i> 2,0
AT AV	16,3 ± 1,5	7,7 ± 0,6	<i>A. retroflexus</i> 2,0	<i>P. lanceolata</i> 1,3	<i>E. repens</i> 1,3
AP VN	7,8 ± 2,6	3,8 ± 0,7	<i>C. arvensis</i> 1,6	<i>A. capillaris</i> 1,4	<i>A. millefolium</i> 0,8
AP AV	7,6 ± 4,9	4,9 ± 3,2	<i>C. arvensis</i> 1,3	<i>L. corniculatus</i> 0,9	<i>E. arvense</i> 0,8
AP AV _(Fe)	12,4 ± 1,4	7,9 ± 1,7	<i>A. capillaris</i> 1,3	<i>P. lanceolata</i> 1,3	<i>C. arvensis</i> 1,2
AP AV _(MO)	6,4 ± 3,5	4,3 ± 3,0	<i>A. capillaris</i> 1,3	<i>C. arvensis</i> 1,3	<i>E. arvense</i> 0,9
AP AV _(Fe+MO)	11,2 ± 1,5	7,0 ± 1,4	<i>C. arvensis</i> 1,0	<i>S. latifolia</i> 1,0	<i>A. capillaris</i> 0,8

A : Coefficient d'abondance-dominance (recouvrement) moyen de chaque espèce (n = 9)

AV : Association Végétale introduite

L'étude floristique réalisée 1 semaine avant la récolte montre une variabilité du nombre d'espèces en fonction des conditions de cultures (Tableau III.13). En effet, la plus grande diversité végétale est observée sur les parcelles témoins avec un peu plus de 16 esp/m². Sur les parcelles polluées (AP), les résultats révèlent une plus grande diversité végétale lorsque celles-ci sont enrichies en grenaille de fer (AP AV_(Fe)). La richesse de la végétation d'origine (AP VN) est comparable à celle observée dans l'association végétale (AP AV), l'apport du fer permettant le développement d'un plus grand nombre d'espèces. La présence de la matière organique (AP AV_(MO)) ne permet pas d'obtenir une plus grande diversité végétale que celle mesurée sur les parcelles sans apport (AP AV).

Tableau III.14 : Coefficient d'abondance-dominance de Braun Blanquet (1964) pour les différentes espèces introduites en fonction des conditions de culture.

	Recouvrement initiale (A_i)	Recouvrement après 3 mois de culture (A_f)						
	AV	AT AV	AT VN	AP AV	AP VN	AP AV _(Fe)	AP AV _(MO)	AP AV _(Fe+MO)
<i>A. capillaris</i>	2,5 - 3 (20 %)	1,0	-	0,7	1,4	1,3	1,3	0,8
<i>A. elatius</i>	2 - 2,5 (10 %)	-	-	0,3	0,8	0,3	0,3	0,6
<i>D. glomerata</i>	2 - 2,5 (10 %)	-	-	0,1	-	0,3	-	-
<i>H. lanatus</i>	2 - 2,5 (10 %)	-	-	0,2	0,1	0,3	0,7	0,2
<i>O. viciifolia</i>	2 - 2,5 (10 %)	1,0	-	0,0	-	0,3	0,1	0,2
<i>M. lupulina</i>	2 - 2,5 (10 %)	0,7	-	0,3	-	0,2	0,2	0,8
<i>L. corniculatus</i>	1 (5 %)	1,0	-	0,9	-	1,0	0,8	0,7
<i>V. faba</i>	1 (5 %)	0,3	-	-	-	0,0	-	0,0
<i>A. millefolium</i>	1 (5 %)	0,3	0,3	0,0	0,8	0,2	-	0,1
<i>E. cyparissias</i>	1 (5 %)	0,3	-	0,4	0,8	0,4	0,1	0,2
<i>P. lanceolata</i>	1 (5 %)	1,3	0,3	0,2	0,2	1,3	-	0,7
<i>S. latifolia</i>	1 (5 %)	0,3	0,0	0,6	0,1	1,1	0,4	1,0

L'étude détaillée des espèces retrouvées sur le site (Tableau III.14) montre que l'apport de fer semble avoir facilité l'implantation des espèces introduites (espèces AV). En effet, comme pour la condition témoin (AT AV), un peu plus de 7 espèces de AV introduites se sont développées sur les parcelles enrichies en fer contre un peu moins de 5 pour les parcelles polluées sans apport (AP AV). Sur les parcelles témoins (AT AV et AT VN), l'amarante réfléchie (*A. retroflexus*), adventice des cultures, est l'espèce dominante, sa présence est probablement causée par la proximité de culture de maïs. Le chiendent officinal (*E. repens*), très présent sur la prairie témoin (cf. Chapitre III.1), est la graminée la plus abondante sur les parcelles témoins, malgré l'apport de 4 autres espèces de graminées. Sur le site pollué, le liseron des champs (*C. arvensis*), espèce invasive non introduite, est présent sur toutes les parcelles, et est toujours retrouvé parmi les espèces dominantes (Tableau III.13). D'autres espèces, non présentes dans l'association végétale, se sont implantées sur les parcelles du site pollué, on peut citer notamment *E. arvense*, *L. repens* ou les Euphorbiaceae. Ces espèces

étaient présentes sur la friche industrielle avant la mise en place des parcelles expérimentales (Tableau III.5), leur développement sur les parcelles indique leur capacité à tolérer la pollution polymétallique du sol.

Par ailleurs, la répartition initiale des espèces dans l'association végétale a évolué différemment en fonction des conditions de culture (Tableau III.14). Sur les espèces introduites (Tableau III.13), l'agrostide commune (*A. capillaris*), le lotier corniculé (*L. corniculatus*), le compagnon blanc (*S. latifolia*) et dans une moindre mesure le plantain lancéolé (*P. lanceolata*), sont les espèces les mieux implantées sur l'ensemble des parcelles polluées. Celles-ci ont donc une aptitude d'adaptation et de développement intéressante en présence d'une pollution polymétallique. L'abondance de *L. corniculatus* et *A. capillaris* indique généralement une faible fertilité du sol (Hubert et Pierre, 2003). Ces espèces ont un faible développement, sur des terres peu fertiles elles ne subissent pas de concurrence d'espèces agressives et peuvent ainsi se développer plus facilement. Par ailleurs, les différentes graminées, dominantes dans l'association végétale initiale, se sont peu implantées sur les parcelles polluées, à l'exception d'*A. capillaris*. Enfin, dans le site pollué, l'ensemble des espèces qui composent l'association végétale ont été identifiées dans une ou plusieurs conditions (Annexe V).

Pour conclure, l'association végétale introduite sur le site pollué s'est relativement bien développée, l'ensemble des espèces la composant sont présentes dans les différentes conditions à l'exception des parcelles où la matière organique a été ajoutée. Par ailleurs, l'apport de grenaille de fer semble permettre une plus grande richesse végétale et avoir facilité l'implantation de l'association végétale introduite.

3.2. Croissance et développement des plantes

L'abondance de la végétation sur chaque parcelle a été évaluée par la mesure de la biomasse aérienne fraîche relevée sur une surface de 1 m² (Figure III.24). Sur le site témoin, le couvert végétal naturel est plus abondant que celui issu de l'association végétale. De même, sur le sol pollué, la végétation indigène (AP VN) présente une biomasse aérienne plus importante que celle obtenue avec l'association végétale (AP AV). Par ailleurs, sur sol pollué sans modification (AP AV), la biomasse végétale a diminué significativement par rapport aux conditions contrôles (AT AV). L'incorporation de grenaille de fer a conduit à un développement d'un couvert végétal plus dense (le poids de la biomasse aérienne est de

73,7 g) que celui mesuré sur sol pollué non amendé ($m_{BA(AP\ AV)} = 31,6$ g) et comparable au développement du couvert végétal naturel. Cette couverture végétale (condition $AP\ AV_{(Fe)}$) est similaire à celle mesurée sur le sol contrôle (AT AV). L'apport de matière organique a eu un effet positif sur le développement du couvert végétal, en effet, la biomasse aérienne mesurée est d'environ 52,4 g. Elle a augmenté d'environ 66 % par rapport à la biomasse aérienne mesurée sur les parcelles sans apport (AP AV). Cependant, le développement du couvert en présence de matière organique est inférieur à celui mesuré dans les conditions contrôles. L'apport des deux amendements ($AP\ AV_{(Fe+MO)}$) confirme ces résultats, le développement du couvert végétal enregistre une augmentation de 50 % de la biomasse aérienne par rapport aux parcelles polluées sans apport, mais reste inférieure à celui relevé sur le site témoin (AT AV).

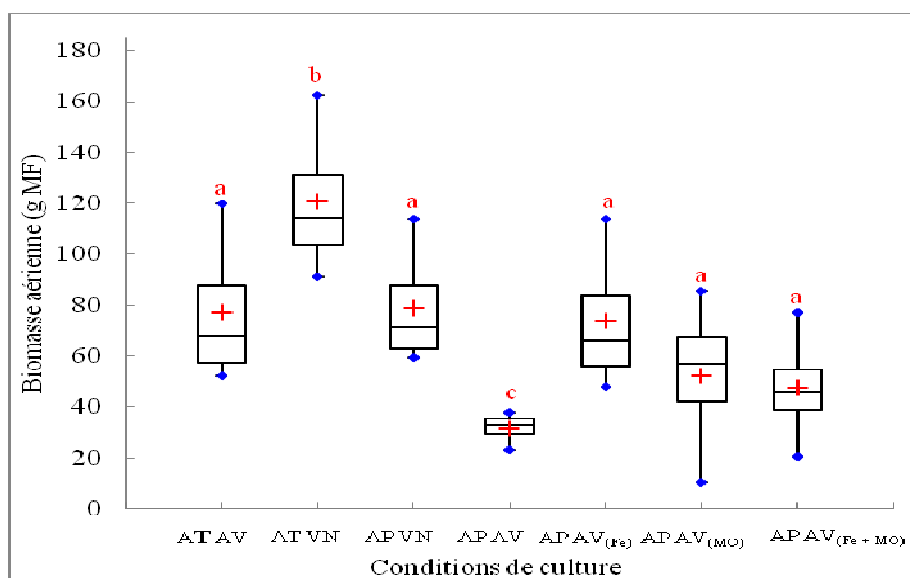


Figure III.24 : Biomasse aérienne (BA) fraîche mesurée après 3 mois de culture pour chaque condition (n = 9).

La Figure III.25 représente l'implantation des couverts végétaux pour les différentes conditions de cultures 2 mois et 15 jours après l'ensemencement des parcelles. Ces photos mettent en évidence un couvert végétal plus dense et homogène sur les parcelles avec amendements ($AP\ AV_{(Fe)}$, $AP\ AV_{(MO)}$, $AP\ AV_{(Fe+MO)}$, Figure III.24 d, e, f). Les amendements, la matière organique sous forme de lombricompost et la grenaille de fer, ont donc facilité l'implantation d'un couvert végétal permettant d'obtenir une végétation plus dense.



Figure III.25 : Photos des parcelles au 10 août 2011, (a) parcelles AT AV, (b) parcelles AP AV, (c) parcelles AP AV_(Fe), (d) parcelles AP AV_(MO), (e) parcelles AP VN, (f) parcelles AP AV_(Fe+MO).

Ainsi, l'étude du développement de la végétation présente donc un grand intérêt pour d'une part évaluer la réussite de la revégétalisation et d'autre part réduire la fraction disponible des polluants du sol et donc *in fine* en diminuer sa toxicité.

4. Comportement des ETM dans le sol

4.1. Etude des teneurs totales et disponibles en ETM dans les différentes parcelles

Suite à la mise en place des parcelles sur le site industriel, une étude de la pollution a été réalisée afin de déterminer les différents polluants du sol, leurs teneurs totales et leurs fractions biodisponibles dans l'horizon de surface pour chaque parcelle.

Tableau III.15 : Teneurs totales et biodisponibles (extraction au CaCl_2) de l'As, du Pb, du Cd, de l'Sb, et du Cu avant la mise en culture pour les différentes conditions de culture (n = 9).

Conditions	Teneurs (mg.kg^{-1})	As	Pb	Cd	Sb	Cu
AT AV	Totale	$207,2 \pm 0,0$	$78,7 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,0$	$39,0 \pm 0,0$	$36,9 \pm 0,0$
	Biodisponible	$1,88 \pm 0,14$	$0,02 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$
AP VN	Totale	$2424,4 \pm 202,6$	$2985,8 \pm 592,4$	$4,73 \pm 1,32$	$6750,8 \pm 3605,9$	$491,2 \pm 106,6$
	Biodisponible	$23,07 \pm 13,54$	$0,42 \pm 0,22$	$0,17 \pm 0,04$	$18,75 \pm 1,28$	$1,75 \pm 0,08$
AP AV	Totale	$1470,8 \pm 571,1$	$1437,9 \pm 584,2$	$5,2 \pm 4,9$	$2338,1 \pm 1164,0$	$506,5 \pm 293,0$
	Biodisponible	$23,65 \pm 12,37$	$0,23 \pm 0,18$	$0,21 \pm 0,13$	$10,60 \pm 5,37$	$2,36 \pm 2,65$
AP AV _(Fe)	Totale	$1982,5 \pm 795,1$	$2501,1 \pm 1154,9$	$4,4 \pm 2,7$	$3182,2 \pm 748,2$	$481,0 \pm 141,5$
	Biodisponible	$14,48 \pm 15,33$	$0,10 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,04$	$16,81 \pm 7,13$	$2,63 \pm 0,88$
AP AV _(MO)	Totale	$2339,3 \pm 795,1$	$2316,2 \pm 749,9$	$12,9 \pm 5,7$	$5650,5 \pm 2317,4$	$526,6 \pm 226,2$
	Biodisponible	$53,89 \pm 40,12$	$0,55 \pm 0,31$	$0,34 \pm 0,13$	$18,57 \pm 5,65$	$5,91 \pm 4,35$
AP AV _(Fe+MO)	Totale	$1412,8 \pm 610,1$	$1635,5 \pm 297,7$	$4,8 \pm 4,6$	$6723,9 \pm 4846,3$	$679,2 \pm 98,5$
	Biodisponible	$8,73 \pm 1,89$	$0,13 \pm 0,17$	$0,16 \pm 0,09$	$18,96 \pm 13,06$	$6,10 \pm 4,39$

Le Tableau III.15 présente les moyennes des teneurs totales et biodisponibles des éléments métalliques et métalloïdes en excès (As, Pb, Sb, Cd, Cu) pour chaque condition de culture. Dans le sol pollué du site industriel (AP), les principaux polluants rencontrés sont l'As, l'Sb et le Pb. En effet, ces éléments présentent des teneurs totales très élevées, supérieures à $1\,400\text{ mg.kg}^{-1}$ pour l'As et le Pb et supérieures à $2\,400\text{ mg.kg}^{-1}$ pour l'Sb quel que soit les conditions de culture. De plus, pour l'As et l'Sb, les teneurs biodisponibles sont supérieures à 10 mg.kg^{-1} . Cette biodisponibilité augmente le risque de transfert vers les milieux voisins et la végétation et accentue donc la toxicité de ces éléments. La pollution du

sol du site industriel d'Auzon (AP) est donc particulièrement marquée par la toxicité de l'As et de l'Sb.

D'autre part, ces résultats mettent en évidence une forte hétérogénéité des teneurs totales et disponibles dans le sol à l'échelle de la partie prairiale, la parcelle 227. Cette distribution spatiale des ETM dans l'horizon superficiel est en adéquation avec les résultats de plusieurs campagnes de terrain sur la répartition de l'As réalisées sur cette même parcelle du site d'Auzon (Laperche et Eisenlohr, 2001 ; Cancès, 2004).

Par ailleurs, le Tableau III.16 présente la fraction biodisponible (%) de chaque élément en fonction des conditions de cultures relevée avant la mise en culture. Ces résultats permettent de déterminer un ordre décroissant de mobilité de ces éléments dans le sol :

$$\text{Cd} > \text{As} > \text{Cu} > \text{Sb} > \text{Pb}$$

En effet, dans les sols, le Cd est considéré comme un élément relativement mobile par rapport à d'autres éléments traces tels que le Cu, le Pb, l'As ou l'Sb (Bourrelrier et Berthelin, 1998). De même, le Pb, est généralement considéré comme un élément immobile fortement retenu par la matrice du sol dans les horizons de surface (Citeau *et al.*, 2008).

Tableau III.16 : Fraction biodisponible (%) de l'As, du Pb, du Cd, de Sb et du Cu avant la mise en culture en fonction des différentes conditions (n = 9).

Conditions de culture	As	Pb	Cd	Sb	Cu
AT AV	0,91 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,79 ± 0,29	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,03
AP VN	1,24 ± 0,81	0,01 ± 0,01	3,51 ± 0,89	0,40 ± 0,22	0,43 ± 0,15
AP AV	1,58 ± 0,71	0,02 ± 0,01	7,35 ± 7,12	0,64 ± 0,43	0,45 ± 0,29
AP AV _(Fe)	0,90 ± 0,46	0,01 ± 0,01	6,16 ± 3,32	0,49 ± 0,13	0,55 ± 0,07
AP AV _(MO)	2,16 ± 1,29	0,02 ± 0,01	2,99 ± 1,41	0,41 ± 0,24	1,04 ± 0,47
AP AV _(Fe+MO)	0,72 ± 0,26	0,01 ± 0,01	5,44 ± 3,53	0,38 ± 0,16	0,95 ± 0,73

Les parcelles enrichies en fer (AP AV_(Fe) et AP AV_(Fe+MO)) montrent une réduction de la fraction biodisponible des éléments traces, principalement pour l'As. En effet, la grenaille de fer incorporée au sol s'oxyde naturellement conduisant à la formation d'oxydes de Fe et Mn tels que les composés ferrihydrites. Ceux-ci réagissent avec les éléments traces présents dans la solution du sol et contribuent ainsi à réduire la mobilité de certains ETM et notamment de l'As, en permettant la fixation de ces éléments à leur surface ou en provoquant des phénomènes de coprécipitation (Mench *et al.*, 2005 ; Kumpiene *et al.*, 2008). Les travaux

d'Adriano (2001) corroborent ces résultats et montrent que dans des sols non contaminés, les oxydes de fer sont connus pour jouer un rôle important dans la rétention des éléments traces.

A noter, que l'ajout de compost (matière organique) au sol entraîne une réduction presque de moitié de la fraction mobile de Cd. Au contraire, une augmentation de la fraction mobile du Cu et de l'As est observée en présence de matière organique.

4.2. Influence du couvert végétal et des amendements sur les teneurs totales et la disponibilité des ETM dans le sol

Les résultats montrent une diminution significative de la biodisponibilité des éléments traces dans le sol rhizosphérique, après la culture des plantes à l'exception du Pb pour 4 des conditions (AP VN, AP AV, AP AV_(Fe) et AP AV_(Fe+MO)) et de Sb pour la condition AP AV_(MO) (Figure III.26).

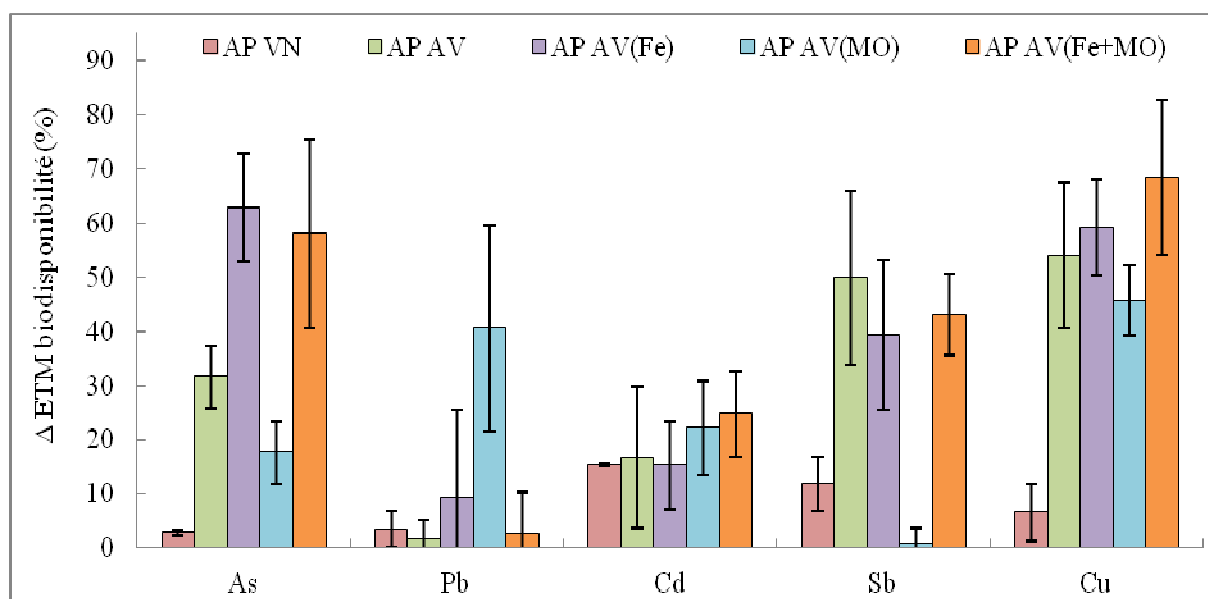


Figure III.26 : Réduction des fractions biodisponibles des ETM (%) suite à la culture des plantes pour les différentes conditions (n = 9).

Ces résultats mettent en évidence l'effet du couvert végétal et du développement d'un réseau racinaire dense sur la disponibilité des éléments dans le sol. En effet, à l'exception de la condition AP AV_(MO) pour l'Sb, une réduction significative des teneurs biodisponibles en As, Cu, Cd et Sb a été observée après 3,5 mois de culture. Le Pb, très peu mobile dans le sol, ne montre pas de variation significative excepté en présence de matière organique. La réduction des teneurs disponibles en ETM en présence du couvert naturel (AP VN) est faible, elle est 5

à 10 fois inférieure à celle observée en présence de la végétation introduite (AP AV) pour l'As, l'Sb et le Cu. L'addition de grenaille de fer dans le sol a permis une réduction plus importante de la fraction biodisponible de l'As et du Cu par rapport aux parcelles sans apport (AP AV). En effet, la fraction mobile de l'As et du Cu est réduite respectivement de 62,8 % et 59,1 % pour la condition AP AV_(Fe) et de 58,1 % et 68,2 % pour la condition AP AV_(Fe+MO) contre 31,7 % et 53,9 % pour la condition AP AV. Au cours de la culture, l'apport de matière organique seul n'a eu aucune incidence sur le comportement dans le sol des différents ETM étudiés à l'exception du Pb. En effet, la matière organique semble jouer un rôle dans la réduction de la mobilité du Pb dans le sol. Des résultats similaires ont été observés par Castaldi et son équipe (2005) sur un site contaminé au Pb après l'ajout de compost.

5. Absorption des éléments métalliques et minéraux par les plantes

5.1. Transfert et stockage des ETM dans les plantes

Les Figures III.27 à III.31 présente les teneurs dans les parties racinaires et aériennes des polluants rencontrés dans le sol de la friche industrielle de la Vieille Usine d'Auzon dans les différentes conditions expérimentales. L'analyse de ces résultats a été réalisée élément par élément. L'hétérogénéité des teneurs en ETM dans les plantes, mise en évidence par des écart types importants, peut être causée par la nature de l'échantillon qui est composé d'un pool d'espèce.

➤ Arsenic (As)

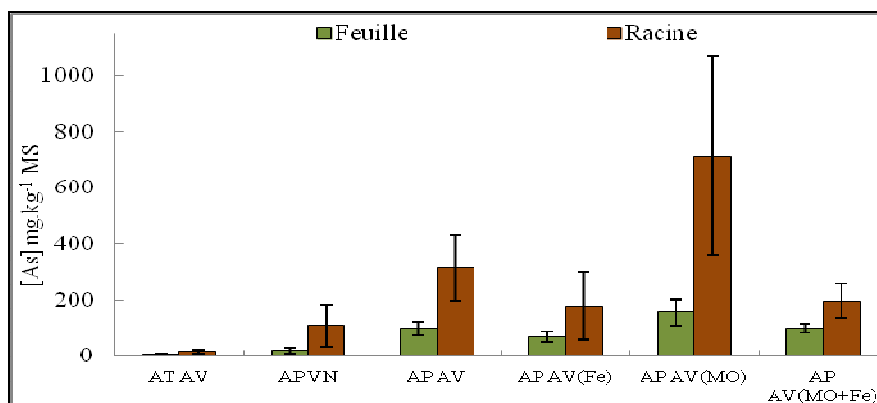


Figure III.27 : Teneurs en As en mg.kg⁻¹ de MS dans les parties aériennes et racinaires de la végétation en fonction des conditions de cultures (n = 9).

La teneur moyenne mesurée dans la partie aérienne de la végétation du site contrôle (AT AV) est d'environ 3,3 mg.kg⁻¹ MS (Figure III.27), valeur conforme aux travaux de Matschullat (2000) qui précise que les teneurs en As de différentes espèces végétales cultivées sur sol non contaminé varient de 0,01 à 10 mg.kg⁻¹ MS. Cependant, les teneurs mesurées dans la végétation témoin dépassent les valeurs guides pour l'alimentation animale (2 mg.kg⁻¹ MS) décrites par Mench et Baize (2004). Sur sol pollué, les plus faibles teneurs en As ont été mesurées dans la végétation indigène du site (AP VN). Les espèces qui composent cette végétation métallicole mettent en place une stratégie excluante pour limiter la phytotoxicité de l'As (Otones *et al.*, 2011). L'amendement grenaille de Fe a diminué l'absorption de l'As par les plantes composant l'association végétale (réduction de 44 % de la teneur moyenne mesurée dans les plantes), l'apport de Fe semble avoir une action sur la phytodisponibilité de l'As. Au contraire, la présence de la matière organique entraîne une augmentation significative de l'accumulation de l'As dans les tissus de la plante. Par ailleurs, ces résultats montrent que l'As est essentiellement stocké dans les racines, entre 75 et 85 % de l'As absorbé est contenu dans les racines.

➤ *Plomb (Pb)*

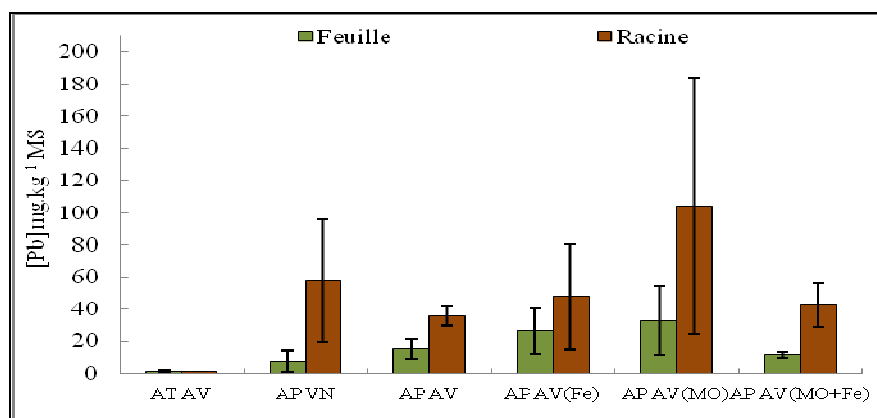


Figure III.28 : Teneurs en Pb en mg.kg⁻¹ de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures (n = 9).

L'accumulation du Pb dans la végétation du site contrôle (AT AV) ne dépasse pas 1 mg.kg⁻¹ MS (Figure III.28). Le couvert végétal naturel du site pollué (AP VN) absorbe de faibles quantités de Pb (en moyenne 33 mg.kg⁻¹ MS dans la plante) dont la majorité est stockée dans les racines (près de 90 %). Comme pour l'As, il semble que les plantes indigènes tolèrent le Pb par la mise en place d'une stratégie d'exclusion au niveau des racines (Shahid,

2010). L'association végétale introduite montre des différences dans l'accumulation du Pb en fonction de la nature des intrants. Alors que les teneurs moyennes de Pb mesurées dans les plantes avec ou sans apport de Fe (AP AV et AP AV_(Fe)) ne montrent pas de variations significatives (respectivement 35 et 37 mg.kg⁻¹ MS de Pb en moyenne dans les plantes) par rapport aux teneurs mesurées dans la végétation indigène (AP VN), la matière organique semble augmenter l'accumulation du Pb par les plantes (68 mg.kg⁻¹ MS de Pb en moyenne accumulé dans la végétation). Ce résultat peut-être à l'origine de la réduction importante de la disponibilité du Pb au cours de la culture. D'autre part, le transfert du Pb dans les parties aériennes de la végétation introduite est faible, une majorité du Pb est stockée dans les racines (entre 65 et 75 % selon les amendements). Ce résultat est observé dans différents travaux sur *Vicia faba* (Shahid *et al.*, 2011), *Allium sativum* (Jiang et Liu, 2010) ou *Avicennia marina* (Yan *et al.*, 2010). Par ailleurs, malgré un stockage important du Pb dans les racines, la concentration en Pb mesurée dans les parties aérienne de la végétation introduite pour l'ensemble des conditions dépasse les valeurs guides pour l'alimentation animale fixées à 10 mg.kg⁻¹ pour le Pb (Mench et Baize, 2004).

➤ Antimoine (Sb)

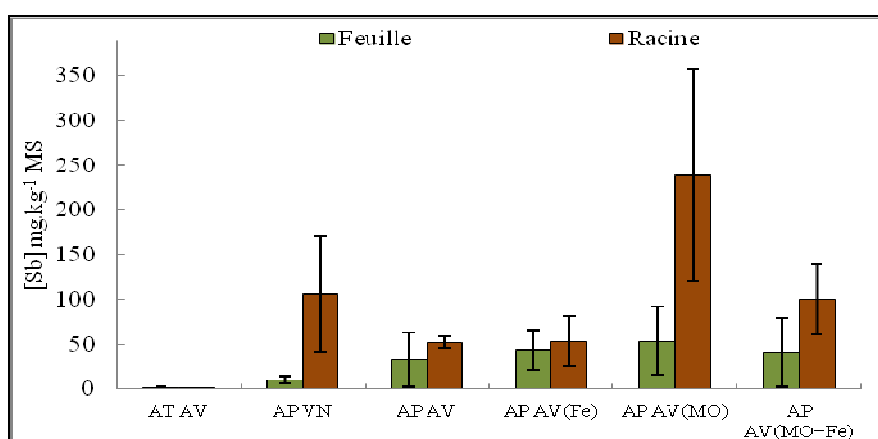


Figure III.29 : Teneurs en Sb en mg.kg⁻¹ de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures (n = 9).

Sur le site témoin, l'association végétale présente de faibles teneurs en Sb, la teneur moyenne mesurée dans les plantes est de 1,1 mg.kg⁻¹ avec une répartition homogène entre les parties aériennes et racinaires des plantes (Figure III.29). Sur le site pollué, contrairement à l'As, les teneurs moyennes d'Sb mesurées dans le couvert naturel sont proches de celles observées dans l'association végétale (58 contre 42 mg.kg⁻¹ MS de Sb respectivement pour les

conditions AP VN et AP AV) et sont relativement faibles par rapport aux teneurs mesurées dans le sol. L'amendement fer n'entraîne pas d'augmentation significative des teneurs en Sb mesurées dans les plantes. Au contraire, l'apport de matière organique est responsable d'une accumulation significativement plus importante de l'Sb dans la végétation. Cependant, alors que la végétation indigène (AP VN) transfère seulement 10 % de Sb absorbé vers les parties aériennes, les teneurs en Sb mesurées dans la partie aérienne de la végétation introduite représente 34 % pour la condition AP AV et atteint 46 % des teneurs absorbées en présence de l'amendement fer (AP AV_(Fe)). Ainsi, quel que soit les conditions de culture, Sb est majoritairement stocké dans les racines. Cette caractéristique couplée à l'exclusion racinaire de Sb permet aux espèces végétales indigènes et à la végétation introduite (excepté en présence de matière organique) de tolérer et de se développer sur des sites contaminés par cet ETM (Beck *et al.*, 2012).

➤ *Cadmium (Cd)*

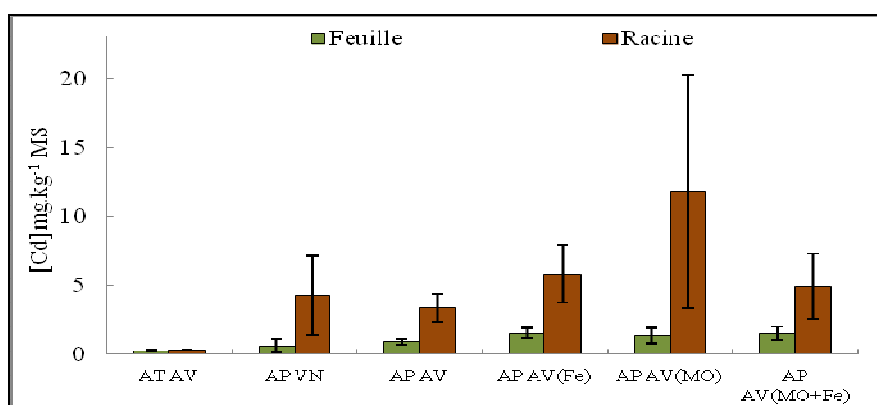


Figure III.30 : Teneurs en Cd en mg.kg⁻¹ de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures (n = 9).

Elément non essentiel pour les plantes (Verbruggen *et al.*, 2009) au même titre que le Pb, l'As ou l'Sb, le Cd est présent en très faible quantité dans la végétation du site témoin (Figure III.30). Les teneurs observées dans la végétation indigène de la friche industrielle sont proches de celles mesurées dans l'association végétale introduite (2,4 contre 2,1 mg.kg⁻¹ MS de Cd respectivement pour la condition AP VN et AP AV). Le Cd absorbé étant principalement stocké dans les racines (environ 80 %). L'apport du Fe ou de la matière organique a entraîné une absorption significativement plus importante de cet élément par les plantes (3,7 et 6,6 mg.kg⁻¹ MS de Cd respectivement pour la condition AP AV_(Fe) et AP

AV_(MO)). L'apport des deux amendements simultanément confirme cette tendance. Ces deux amendements semblent donc agir sur la phytodisponibilité du Cd dans le sol.

➤ Cuivre (Cu)

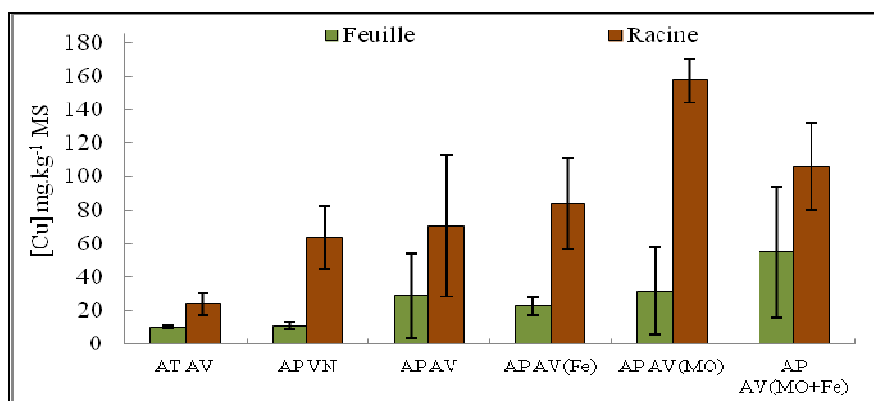


Figure III.31 : Teneurs en Cu en mg.kg⁻¹ de MS dans les parties aériennes et racinaires des plantes en fonction des conditions de cultures (n = 9).

Le Cu, oligoélément essentiel pour la croissance des plantes, est l'élément trace étudié le plus concentré dans la végétation du site témoin (teneur moyenne de 17,0 mg.kg⁻¹) (Figure III.31). Sur les parcelles polluées, la végétation naturelle absorbe moins de Cu que l'association végétale introduite, respectivement 37,2 et 49,5 mg.kg⁻¹ MS. L'amendement de grenaille de Fe n'influence pas l'absorption du Cu par les plantes. Au contraire, l'apport de matière organique entraîne une augmentation significative de l'accumulation du Cu dans la végétation (94,5 mg.kg⁻¹), en particulier au niveau des racines. Celle-ci peut être reliée à une augmentation de la fraction mobile du Cu en présence de matière organique observée précédemment (Tableau III.16). Comme pour les autres éléments métalliques ou métalloïdes, le Cu absorbé est majoritairement stocké dans les racines, entre 70 et 85 % du Cu accumulé dans la végétation est retenu dans les racines quel que soit les conditions de culture.

Les Facteurs de Translocation (FT) confirment les résultats précédents (Figure III.32). Pour l'ensemble des ETM étudiés et à l'exception de la condition contrôle (AT AV), les FT sont inférieurs à 1, ils sont donc stockés préférentiellement dans les racines. A l'exception du Cd, la végétation introduite sur les parcelles polluées (AP AV) présente des FT significativement plus élevés que la végétation indigène (AP VN) pour l'ensemble des ETM. Alors que la présence du fer ne modifie pas cette tendance (AP AV_(Fe)), la végétation cultivée

sur des parcelles enrichies en matière organique semble réduire le transfert des métaux et métalloïdes vers les parties aériennes. L'Sb semble être l'élément dont les quantités transférées dans les feuilles sont les plus importantes.

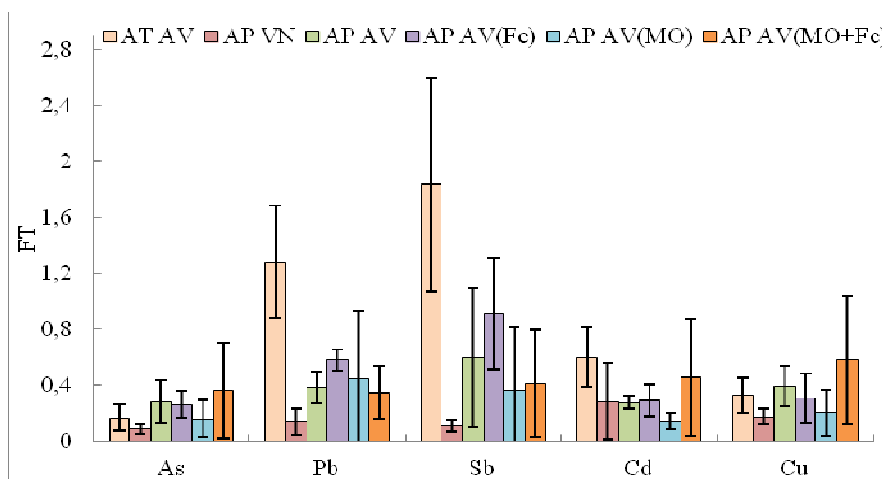


Figure III.32 : Facteurs de Translocation (FT) entre les feuilles et les racines des différents ETM calculés en fonction des conditions de culture (n = 9).

L'étude des Facteurs de Bioaccumulation (FB) montre que le Cd est l'élément le plus accumulé par les plantes et donc le plus phytodisponible des polluants présent dans le sol industriel d'Auzon. L'apport de grenaille de Fe au sol entraîne une augmentation du FB du Cd et donc une augmentation de son accumulation dans les plantes. Dans ces conditions (AP AV_(Fe) et AP AV_(Fe+MO)), la valeur du FB du Cd est supérieure à 1 et met en avant des teneurs dans les plantes supérieures aux teneurs totales mesurées dans le sol, c'est un élément très phytodisponible. L'étude des FB confirme par ailleurs que le Cu et l'As sont les deux autres éléments les plus disponibles dans le sol et donc les plus accumulés dans les plantes. Par ailleurs, en présence de la végétation indigène (AP VN), seul l'As présente un FB significativement plus faible que celui observé pour la végétation introduite. De plus, l'apport de grenaille de fer au sol permet de réduire significativement la phytodisponibilité de l'As et donc son accumulation par les plantes, la valeur du FB est de 0,14 et 0,06 respectivement pour les conditions AP AV et AP AV_(Fe). En présence de fer, la valeur du FB de l'As est comparable aux FB de la parcelle témoin (AT AV) et de celui relevé en présence du couvert naturel (AP VN). Enfin, la faible valeur des FB du Pb et de l'Sb met en avant la faible phytodisponibilité de ces éléments dans le sol d'Auzon. Ces résultats confirment l'ordre décroissant de mobilité de ces ETM observé dans le Tableau III.16. La phytodisponibilité du Cu supérieure à celle de l'As d'après les calculs des FB peut être la conséquence du caractère

essentiel du Cu pour les plantes, considéré comme un oligoélément et ainsi accumulé préférentiellement par les plantes.

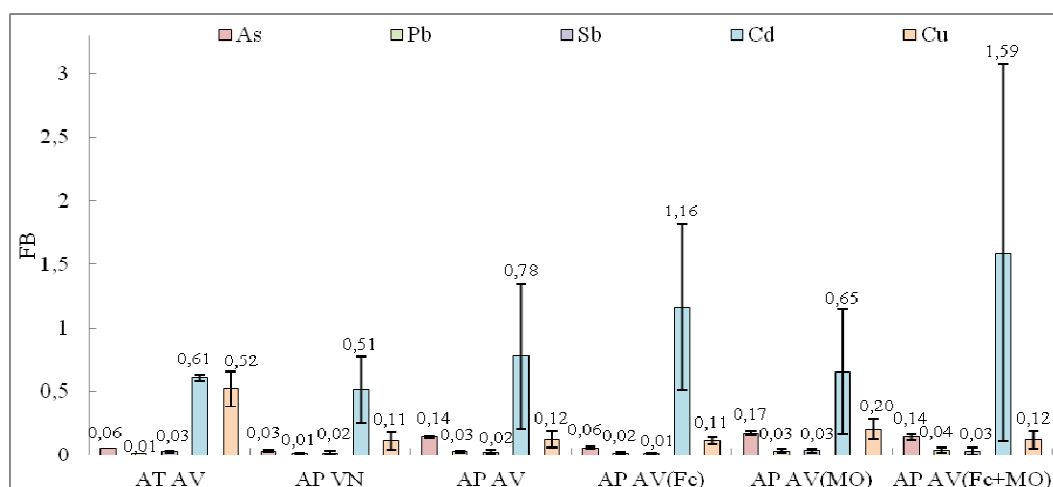


Figure III.33 : Facteurs de Bioaccumulation (FB) représentant le rapport entre les teneurs dans la plante et les teneurs totales dans le sol des différents ETM calculés en fonction des conditions de culture (n = 9).

5.2. Teneur en phosphore et en fer dans les plantes

➤ Fer (Fe)

L'étude des teneurs en Fe (Figure III.34) dans les plantes montre que le couvert végétal du site témoin accumule moins de fer que la végétation présente sur le site pollué (respectivement 15 et 39 mg.kg⁻¹ MS de Fe en moyenne dans la plante). De même, la végétation inféodée au site pollué (AP VN) accumule moins de Fe que la végétation introduite (AP AV), en particulier au niveau des feuilles. L'ajout de grenaille de fer au sol entraîne une augmentation des teneurs en Fe dans les plantes (59,8 mg.kg⁻¹ MS dans la condition AP AV_(Fe) et 93,3 mg.kg⁻¹ MS dans la condition AP AV_(Fe+MO)). Pour ces deux conditions, les teneurs en Fe sont significativement plus importantes dans les racines, phénomène probablement causé par l'ajout d'amendement fer au sol. Les teneurs mesurées dans les feuilles de la végétation du site pollué ne montrent pas de variation significative entre les différentes conditions, elle est d'environ 40 mg.kg⁻¹ MS. Par ailleurs, quelles que soient les conditions de culture, les teneurs en Fe mesurées dans la végétation introduite n'entraînent ni carence, ni toxicité. En effet, pour des plantes herbacées, la carence est susceptible de se

produire pour des teneurs inférieures à 20 mg.kg⁻¹ dans les feuilles (Plank, 1999), et une toxicité de cet élément chez les plantes est observée à partir de teneurs supérieures à 250 mg.kg⁻¹ MS (Majerus *et al.*, 2007).

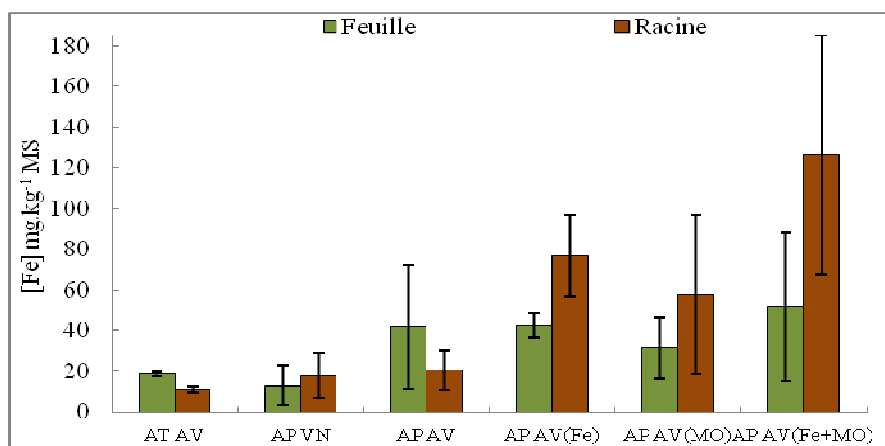


Figure III.34 : Teneurs en Fe dans les feuilles et les racines des plantes pour les différentes conditions de culture (n = 9).

➤ Phosphore (P)

Les teneurs en phosphore (Figure III.35) mesurées dans les plantes montrent une variation en fonction du sol de culture. En effet, sur le sol AT où des espèces non herbacées telles que la ronce sauvage (*R. fruticosus*) se sont développées, les teneurs en phosphore dans les plantes sont significativement plus importantes que celles mesurées dans la végétation développée sur sol pollué (2,7 g.kg⁻¹ contre 1,5 g.kg⁻¹ respectivement pour les conditions AT AV et AP AV). Excepté en présence de matière organique, les teneurs mesurées dans les feuilles sont significativement plus élevées que celle mesurées dans les racines. L'ajout de compost au sol est responsable d'un apport en phosphore pouvant être à l'origine des teneurs plus élevées dans les racines de la végétation et ainsi justifier l'absence de différence significative entre les organes aériens et racinaires. Sur le site pollué, malgré une exigence en phosphore variable chez les plantes, les teneurs relevées dans la végétation ne montrent pas de différence significative en fonction de la nature des intrants. Plank (1999) relève des besoins en phosphore relativement faibles avec des valeurs comprises entre 0,12 et 0,15 % chez les plantes pérennes, teneurs observées dans la végétation du site pollué.

Ces résultats suivent une tendance inversée par rapport aux teneurs en phosphore mesurées dans le sol.

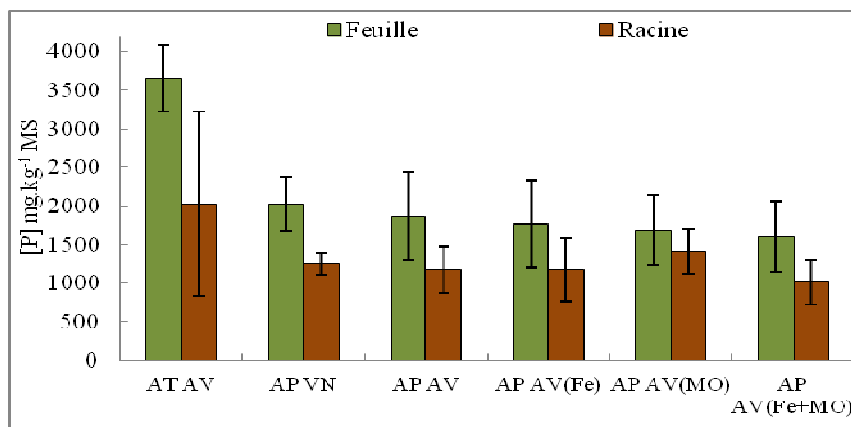


Figure III.35 : Teneurs en phosphore dans les feuilles et les racines de la végétation pour les différentes conditions de culture (n = 9).

6. Discussion

6.1. Développement du couvert végétal

Le premier objectif de la phytostabilisation est d'obtenir une couverture végétale dense et bien équilibrée. Dans cette optique, deux aspects sont particulièrement important à prendre en compte :

- L'utilisation d'espèces non-invasives, tolérantes, non-accumulatrices et adaptées aux conditions pédogéochimiques et climatiques du milieu ;
- Le choix des espèces pour obtenir une association végétale équilibrée et riche permettant une meilleure intégration paysagère.

En effet, le choix des espèces introduites sur le site pollué doit permettre le développement d'un couvert végétal homogène, il est donc indispensable de considérer les interactions, de synergie ou d'antagonisme, susceptibles de s'établir entre les espèces (Frérot *et al.*, 2006). En effet, comme dans les milieux naturels où les espèces se regroupent en associations caractéristiques, Remon (2006) a mis en évidence l'existence d'associations végétales propres aux sites métallurgiques. Cette caractéristique est observée sur le site pollué avec le développement d'une végétation assez homogène sur les différentes parcelles mis en évidence par le calcul de l'indice de similarité de Jacquard présenté dans le Tableau III.17.

Tableau III.17 : Indice de Jacquard calculé entre chaque condition.

	AV	AT AV	AT VN	AP VN	AP AV	AP AV _(Fe)	AP AV _(MO)	AP AV _(Fe+MO)
AV	1	0,38	0,06	0,29	0,59	0,5	0,5	0,5
AT AV	0,38	1	0,33	0,21	0,34	0,29	0,38	0,45
AT VN	0,06	0,33	1	0,13	0,14	0,11	0,19	0,22
AP VN	0,29	0,21	0,13	1	0,46	0,48	0,29	0,54
AP AV	0,59	0,34	0,14	0,46	1	0,69	0,53	0,58
AP AV _(Fe)	0,5	0,29	0,11	0,48	0,69	1	0,44	0,73
AP AV _(MO)	0,5	0,38	0,19	0,29	0,53	0,44	1	0,43
AP AV _(Fe+MO)	0,5	0,45	0,22	0,54	0,58	0,73	0,43	1

Les résultats obtenus montrent que, d'une part, il existe très peu de similitude entre la végétation naturelle du site témoin (AT VN) et la végétation indigène du site pollué (AP VN, $I_j = 0,13$). D'autre part, la végétation introduite (AV), composée essentiellement d'espèces métalphytes, est différente du couvert végétal naturel présent sur le site témoin (AT VN, $I_j = 0,06$) et, dans une moindre mesure, de la végétation développée sur le site pollué (AP VN, $I_j = 0,29$). De plus, le couvert végétal obtenu suite à l'introduction de l'association végétale sur le site témoin a présenté une adaptation et un développement des espèces assez éloignés de ceux observés sur le site pollué. Finalement, ces résultats mettent en avant une similitude dans le développement de l'association végétale (AV) entre les différentes parcelles du site pollué (AP) quel que soit les apports effectués au niveau du sol. Ces observations confirment le caractère spécifique de la végétation d'un site pollué.

Par ailleurs, la valeur élevée de l'indice de Jacquard ($I_j=0,73$) mesurée entre les parcelles enrichies en grenaille de fer (AP AV_(Fe) et AP AV_(Fe+MO)) indique un grand nombre d'espèces communes sur ces parcelles. Ainsi, le développement et la composition du couvert végétal ont été influencés par la présence des composés ferreux dans le sol.

L'étude de la diversité de la végétation a donc validé le choix des espèces végétales sélectionnées qui ont permis le développement d'une végétation relativement homogène et tolérante à la pollution du sol, malgré l'utilisation d'écotypes non métallicoles.

Ce résultat est confirmé par l'étude de l'abondance végétale sur chaque parcelle, qui met en évidence une revégétalisation de l'ensemble des parcelles installées à l'exception d'une

parcelle (condition AP AV_(MO), Figure III.25d). La couverture végétale montre un recouvrement d'au moins 50 % des parcelles et atteint presque 100 % pour certaines parcelles enrichies en fer. L'apport d'amendements a permis d'une part, en ce qui concerne la grenaille de fer, d'augmenter la diversité végétale, et d'autre part, que ce soit l'apport de matière organique ou de fer, d'obtenir une abondance significativement plus élevées par rapport aux parcelles polluées sans apport. En effet, la mauvaise qualité du substrat est un des facteurs limitants pour la phytostabilisation des sites métallurgiques (Ruttens *et al.*, 2010). Outre des teneurs anormalement élevées en ETM et des pH souvent acides, ces anthroposols sont déséquilibrés en éléments nutritifs, pauvres en matière organique et souvent très drainants (Remon, 2006). Dans ces conditions, il était important de rééquilibrer la composition du substrat et de favoriser la reconstruction d'un sol apte à supporter un couvert végétal. L'addition d'amendements organiques a donc été préconisée pour enrichir et favoriser le développement d'un couvert végétal (Renella *et al.*, 2008). L'apport de la grenaille de fer a été réalisé dans le but de réduire la mobilité des ETM et donc leur phytotoxicité (Mench *et al.*, 2005).

6.2. Influence d'un procédé de phytostabilisation sur les teneurs en éléments traces et leur disponibilité dans le sol

Le deuxième objectif de la phytostabilisation est la réduction des transferts de polluants de la source (sites industriels, miniers) vers les milieux voisins et les organismes vivants (faune, flore, micro-organismes). Dans cette optique, deux aspects doivent être traités :

- L'influence de la revégétalisation et des amendements sur la spéciation et la mobilité des ETM (Pb, Cd, Cu, As, Sb) ;
- Le transfert des ETM vers la végétation.

6.2.1. Spéciation et mobilité des ETM dans le sol

Comme il a été montré précédemment, l'apport d'amendement d'origine inorganique (grenaille de fer) ou organique (matière organique sous forme de compost) a facilité le développement du couvert végétal. En effet, ces amendements ont entraîné des modifications de la composition et des propriétés physico-chimiques du sol rhizosphérique pouvant être à l'origine de plusieurs processus :

- Une réduction de la mobilité des ETM et donc de leur phytotoxicité ;

- Une amélioration des qualités agronomiques du sol favorisant le développement du couvert végétal.

La grenaille de fer contient principalement du Fe (Fe(0), 97 %) et quelques impuretés tel que le Mn (Mench *et al.*, 2000) ou la silice (Si 0,8 à 1,2 %) (Jacquemin *et al.*, 2006). L'apport de grenaille de fer au sol a eu pour première conséquence une modification des propriétés physico-chimiques du sol rhizosphérique avec notamment une diminution du pH et une augmentation de la CEC. Ces phénomènes sont liés à l'oxydation du Fe(0) dans le sol générant des oxydes de fer et libérant des ions ferreux (Fe²⁺) majoritaires dans un sol acide (Mench *et al.*, 1998). L'oxydation des ions ferreux en oxyhydroxydes de fer (III), tels que les composés férihydrites, est responsable d'une libération de protons dans le sol modifiant les propriétés physico-chimiques du sol (Leupin et Hug, 2005) :

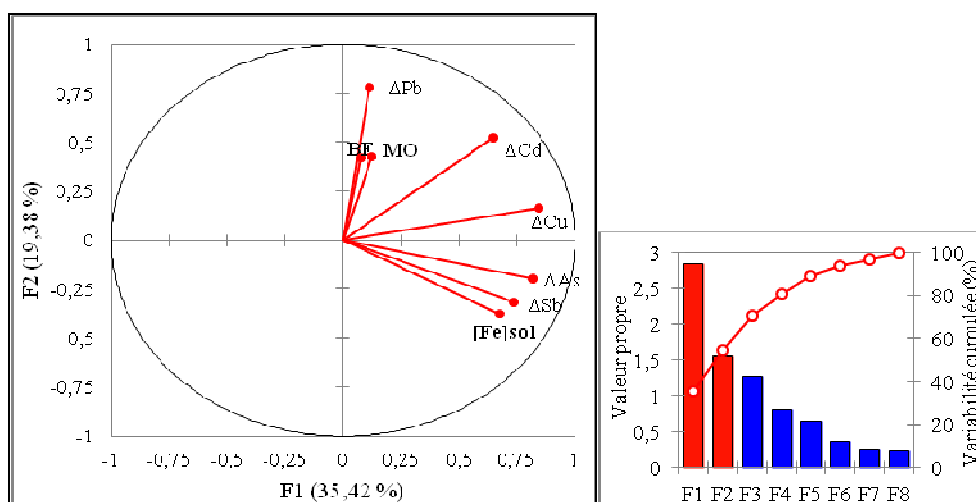
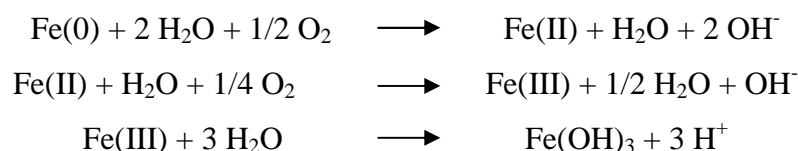


Figure III.36 : Représentation de l'influence des amendements et du développement de la biomasse aérienne (BF) sur la mobilité des métaux (extraction au CaCl₂). ACP réalisée en prenant en compte les différentes conditions expérimentales sur sol pollué (n = 9 pour chaque condition), MO = Matière organique.

D'après la Figure III.36, la présence de Fe(0) permettant la formation des oxyhydroxydes a permis une réduction de la mobilité de certains ETM et en particulier de l'As et de l'Sb. En effet, la mobilité de l'As est principalement contrôlée par les processus

d'adsorption/désorption ou de co-précipitation avec les oxydes métalliques (Hartley et Lepp, 2008). A pH faible (respectivement de 5,3 et 5,1 pour les conditions AP $AV_{(Fe)}$ et AP $AV_{(Fe+MO)}$), l'adsorption de l'arséniate est favorisée (Matera, 2001). De plus, l'acidité du sol augmente la mobilité des ions Fe, Al ou Mn, favorisant la co-précipitation de l'As avec les oxydes de Fe pour former des arséniates de fer insolubles tel que la scorodite ($FeAsO_4 \cdot 2H_2O$) (Adriano, 2001 ; Porter *et al.*, 2004). La réduction de la disponibilité de l'As suite à l'apport de grenaille de fer au sol est confirmée par la forte corrélation existante ($R^2 = 0,76$) entre la réduction de la fraction mobile de l'As et les teneurs en fer dans le sol (Figure III.37).

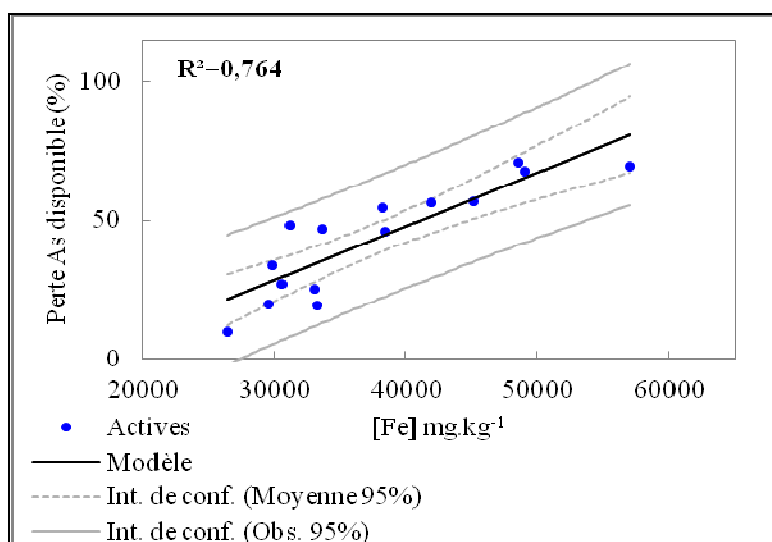


Figure III.37 : Régression linéaire entre la réduction de l'As disponible (extraction au $CaCl_2$) et les teneurs en fer dans le sol.

Le principal avantage de l'utilisation de la grenaille de fer zérovalent ($Fe(0)$) au lieu des sels de Fe ($Fe(II)$ et $Fe(III)$) est que le fer zérovalent contient trois fois plus de fer par unité de poids que les sels de Fe (Kumpiene *et al.*, 2008). Malgré des réactions d'oxydation lentes de $Fe(0)$ dans le sol, son utilisation peut ainsi s'avérer bénéfique dans une perspective à long terme. De plus, Leupin et Hug (2005) ont observé que la libération lente et continue de $Fe(II)$ par la corrosion du fer fournit des conditions idéales pour l'oxydation d' $As(III)$ en $As(V)$, l'arséniate étant plus facilement adsorbé sur les oxyhydroxydes de fer. Cependant, la réduction du pH suite au traitement a probablement limité l'adsorption de certains ions métalliques notamment le Cd, élément très sensible aux variations du pH (Martin-Garin et Simon, 2004).

L'apport de la matière organique n'a eu que peu d'incidence sur le comportement des métaux et métalloïdes dans le sol (Figure III.36). En effet, seule une réduction des teneurs

disponibles en Cd et en Pb après 3 mois de culture a été observée suite à l'ajout de compost. Ceci peut s'expliquer par la capacité de la matière organique à interférer avec le Cd par des phénomènes de complexation et ainsi limiter sa mobilité (Martin-Garin et Simon, 2004). De même, malgré sa faible mobilité dans le sol AP, le Pb présente une grande affinité avec la matière organique et l'argile, spécialement pour des sols ayant un pH supérieur à 5 (Lamy, 2002). Cette caractéristique pourrait expliquer la réduction importante de sa mobilité en présence de matière organique. Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en matière organique dans le sol a entraîné une mobilisation accrue du Cu et de l'As. Concernant le Cu, la fraction biodisponible peut être influencée par une diminution du pH de 0,5 unités observée sur les parcelles cultivées en présence de matière organique (Kumpiene *et al.*, 2007). D'autre part, l'affinité du Cu avec la matière organique a été mise en évidence par Hsu et Lo (2000). Cette propriété a deux conséquences :

- En présence de matière organique dissoute, des complexes Cu-HA (acide humique) et Cu-FA (acide fulvique) sont formés et augmentent la mobilité du Cu (Kumpiene *et al.*, 2008).
- Dans certains cas, la matière organique non dissoute peut fixer le Cu et ainsi diminuer significativement les teneurs en Cu dans la solution du sol (Chirenje et Ma, 1999), phénomène observé pour le Cd.

Dans notre cas, la matière organique semble augmenter la biodisponibilité du Cu dans le sol pollué (AP AV_(MO)). Ce résultat est confirmé par les travaux de Kizilkaya (2004) qui a observé une augmentation de la biodisponibilité du Cu dans des sols pollués en présence de teneurs élevées en matière organique.

Le comportement de l'As en présence de matière organique est controversé (Kumpiene *et al.*, 2007). Cao et Ma (2004) ont utilisé des amendements de compost pour traiter des sols contaminés au CCA et ont observé une adsorption de l'As sur la matière organique et une diminution de son accumulation dans les plantes. Au contraire, comme dans le cas de notre étude, Fitz et Wenzel (2002) n'ont pas observé de contribution de la matière organique sur la mobilité de l'As. Une étude récente de Hartley *et al.* (2010) a montré que la mobilité de l'As et en particulier de l'arséniate, principale forme dans le sol du site industriel (AP), augmentée suite à l'ajout de compost de déchet vert. De fait, la matière organique, n'ayant qu'un faible impact sur la mobilité des ETM, semble essentiellement jouer un rôle dans le développement de la végétation (Figure III.36) grâce à une amélioration de qualité agronomique du sol pollué.

Le développement de la végétation est responsable d'une réduction de la mobilité de l'ensemble des ETM quel que soit les conditions, le Cu étant l'élément dont la mobilité est la plus influencée par la présence d'un couvert végétal. L'effet de la végétation sur la mobilité des ETM dans le sol peut être la conséquence de plusieurs phénomènes (Remon, 2006 ; Alkorta *et al.*, 2010) :

- Un impact de la végétation sur les propriétés physico-chimiques du sol influençant la mobilité des ETM (Pb, Cd, Cu, As, Sb) ;
- Un rôle important du système racinaire dans la fixation des ETM.

En effet, une modification des paramètres physico-chimiques du sol (pH, CEC) a été enregistrée suite à la culture des plantes. Celle-ci a entraîné une réduction de pH et une augmentation de la CEC exceptée sur les parcelles avec ajouts de grenaille de fer (AP $AV_{(Fe)}$ et AP $AV_{(Fe+MO)}$). Outre un enrichissement en matière organique qui peut favoriser l'immobilisation des polluants métalliques et métalloïdes, les végétaux libèrent des exsudats racinaires dont la diversité et les propriétés précises sont encore mal connues mais qui pourraient notablement modifier la spéciation des ETM (Baudoin *et al.*, 2003, Ruttens *et al.*, 2010). De plus, l'étude des facteurs de translocation (Figure III.32) entre les parties racinaires et aériennes de la végétation du site pollué, dont la valeur est toujours inférieure à 1, met en évidence un stockage préférentiel des polluants métalliques et métalloïdes dans les racines des plantes. Le système racinaire peut donc être considéré comme un puits à ETM permettant leur fixation et donc leur immobilisation dans la rhizosphère.

6.2.2. Transfert des ETM vers la végétation

Les plantes sont considérées comme une source secondaire de dispersion des polluants (Ruttens *et al.*, 2010), la question du transfert des ETM vers la biomasse végétale aérienne est importante pour évaluer le risque potentiel de contamination de la chaîne alimentaire. L'importance de ce phénomène dépend de plusieurs paramètres, d'une part, de l'espèce végétale et de ses adaptations aux polluants, et d'autre part, des conditions édaphiques et principalement des teneurs en ETM, de leur biodisponibilité et des conditions pédogéochimiques du sol. Il est donc primordial, dans une démarche de phytostabilisation, de limiter l'accumulation des ETM dans la biomasse aérienne de la végétation.

Tableau III.18 : Teneurs en ETM dans la biomasse aérienne des plantes en fonction des conditions de culture (n = 9).

(mg.kg ⁻¹ MS)	As	Pb	Sb	Cd	Cu
AT AV	4,00 ± 1,00	1,26 ± 0,52	1,52 ± 0,34	0,26 ± 0,07	10,12 ± 0,90
AP VN	18,07 ± 10,62	7,41 ± 6,72	10,30 ± 3,99	0,60 ± 0,46	10,78 ± 1,94
AP AV	96,35 ± 23,92	15,18 ± 6,14	32,68 ± 30,77	0,91 ± 0,20	28,90 ± 25,21
AP AV _(Fe)	66,27 ± 18,69	26,31 ± 14,44	43,22 ± 22,13	1,54 ± 0,35	22,63 ± 5,15
AP AV _(MO)	154,24 ± 45,74	32,66 ± 21,58	53,71 ± 38,61	1,37 ± 0,58	31,85 ± 26,34
AP AV _(Fe+MO)	97,97 ± 15,30	11,66 ± 2,23	41,22 ± 38,30	1,50 ± 0,49	54,62 ± 38,77
Teneurs naturelles	0,01 - 10 ¹	-	0,1 ²	0,02 - 0,5 ³	4 - 20 ⁴
Seuil réglementaire*	2,27 ⁵	45,45 ⁶		1,14 ⁷	

¹ Matschullat, 2000

² Markert, 1996

³ Martin-Garin et Simon, 2004

⁴ Larcher, 2003

* Seuil réglementaire en France pour les éléments en traces dans les fourrages et aliments pour animaux en µg.g⁻¹

¹ MS, Arrêté 12/01/2001, modifié 5/08/2003. Approximation réalisée à partir des teneurs évaluées dans du matériel végétal à 12 % d'humidité.

⁵ Matières premières pour aliments des animaux

⁶ Fourrages verts pour aliments des animaux

⁷ Aliments des animaux d'origine végétale

Ainsi, l'étude des teneurs en ETM (As, Pb, Sb, Cd, Cu) dans la biomasse aérienne est présentée dans le Tableau III.18. Les teneurs mesurées dans les parties aériennes de la végétation du site témoin (AT) sont comprises dans la gamme de concentrations naturelles relevées dans la végétation exceptée pour Sb. Celles-ci peuvent donc être prises comme référence dans l'étude du transfert de ces éléments dans la biomasse aérienne de la végétation du site pollué. En effet, la végétation du site contaminé présente des teneurs relativement élevées pour l'ensemble des ETM. Elles sont nettement supérieures à celles mesurées dans la végétation du site témoin et de fait, supérieures aux teneurs naturelles relevées dans la végétation de sites non contaminés. Cependant, la végétation indigène du site (AP VN) limite l'accumulation des ETM dans la partie aérienne. Les espèces la composant sont des écotypes résistants qui développent pour un très grand nombre une stratégie excluante capable de limiter l'absorption des polluants (Dazy, 2008). L'association végétale introduite (AV), formée d'espèces dont les phénotypes ne sont pas adaptés à la pollution du sol, accumule une plus grande quantité d'éléments traces dans sa partie aérienne. Cependant, l'apport d'amendements au sol semble jouer un rôle dans la phytodisponibilité des éléments. En effet, l'incorporation

de grenaille de fer au sol diminue la disponibilité et donc l'accumulation de l'As et du Cu dans les parties aériennes des plantes. Au contraire, l'apport de la matière organique provoque une plus grande phytodisponibilité des ETM et donc une accumulation accrue de ces polluants dans la végétation (Figure III.38). A noter que, sur le site pollué, les teneurs en Pb mesurées dans les parties aériennes sont inférieures au seuil règlementaire concernant les fourrages verts pour aliments des animaux.

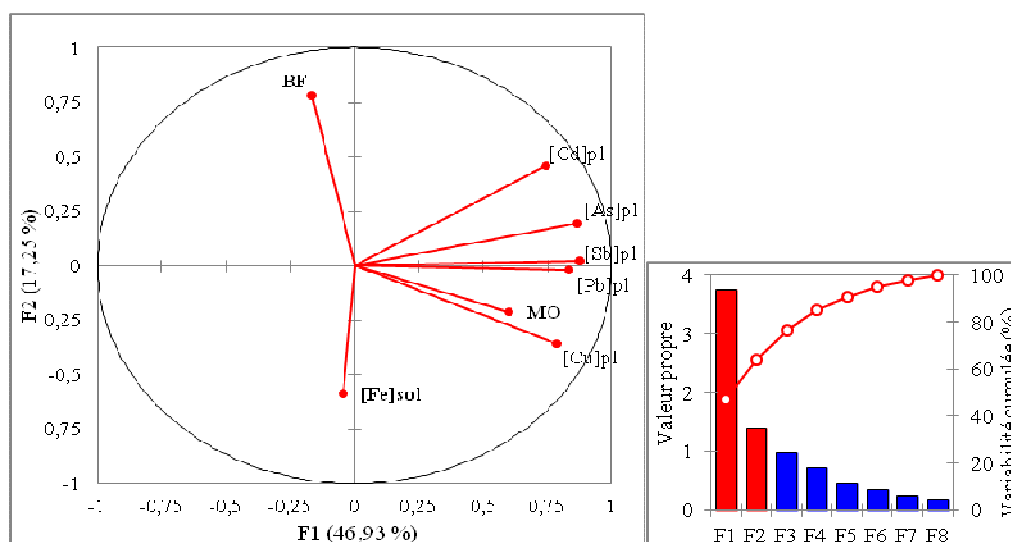


Figure III.38 : Représentation de l'influence des amendements et du développement de la biomasse aérienne (BF) sur le transfert des ETM vers la végétation. ACP réalisée en prenant en compte les différentes conditions expérimentales sur sol pollué (n = 9 pour chaque condition), MO = Matière organique.

Corrélation Arsenic-phosphore

L'étude des teneurs en phosphore dans le sol montre une évolution inverse à celle observée dans les plantes. De plus, la Figure III.39 montre qu'il existe une corrélation entre les teneurs en phosphore mesurées dans le sol et l'accumulation de l'As dans la plante ($R^2 = 0,65$). Ces caractéristiques semblent être la conséquence, d'une part, de la compétition entre l'As et le P pour les surfaces d'adsorption au niveau du sol et, d'autre part, de la compétition de ces deux éléments au niveau de l'absorption racinaire *via* les transporteurs du phosphore. Ce phénomène a pour conséquence une augmentation de l'absorption de l'As par les plantes en réponse à une élévation des teneurs en phosphore dans le sol. De nombreux travaux (Cao et Ma, 2004 ; Tu *et al.*, 2004 ; Santos *et al.*, 2008) corroborent ces résultats.

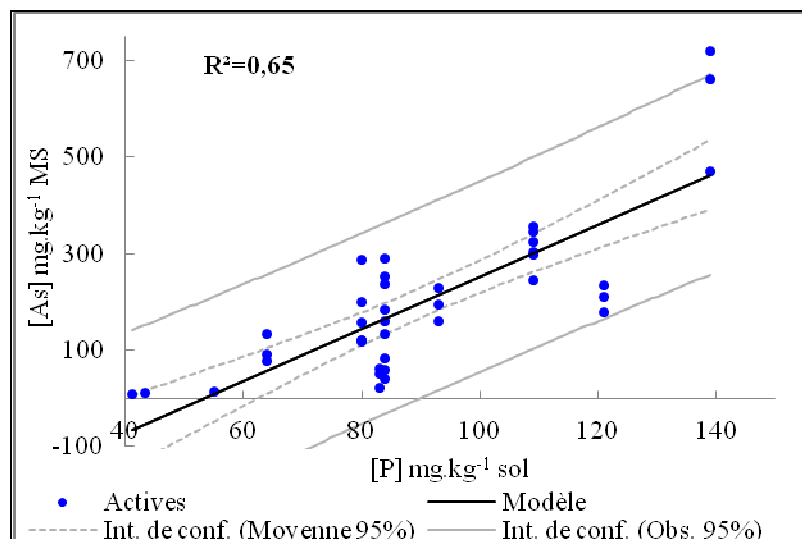


Figure III.39 : Régression linéaire entre les teneurs en As dans la plante et les teneurs en phosphore dans le sol à partir des observations de chaque condition.

Ainsi, l'utilisation de la phytostabilisation comme procédé de dépollution nécessite l'utilisation de plantes pérennes tolérantes mais non accumulatrices en ETM permettant la revégétalisation d'un site contaminé pour limiter la dispersion des polluants soit par lessivage, soit par érosion du sol, soit par transfert dans les organismes vivants et donc, de fait, dans la chaîne trophique. Applicable au cas par cas, la phytostabilisation doit, pour faciliter son application et augmenter son efficacité, tenir compte à la fois des polluants présents, de leur concentration et de leur disponibilité dans le sol, des espèces végétales susceptibles de les tolérer, des conditions pédologiques et climatiques du milieu ainsi que des voies de transfert possibles (Mench *et al.*, 2005). En conséquence, son développement nécessite une expertise en amont couvrant un ensemble de situations les plus diverses possibles.

La mise en place d'un procédé de phytostabilisation sur le site de la Vieille Usine d'Auzon a permis une réduction des transferts, une protection/reconstruction des sols, une reconquête végétale et donc une restauration écologique de ce milieu fortement anthropisé. L'expérimentation a montré que l'apport de grenaille de fer facilitait la fixation des métaux dans le sol rhizosphérique, son apport s'est donc révélé efficace pour la mise en place d'un procédé de phytostabilisation d'un sol présentant une pollution polymétallique. L'amélioration des qualités agronomiques du sol pollué (apport de compost, maintien du pH avec de la chaux) est préférable pour faciliter la revégétalisation.

Chapitre IV : Caractérisation des mécanismes de tolérance et de toxicité de l'arsenic chez deux espèces végétales Solanum nigrum et Vicia faba

Pour mieux cibler l'impact de l'As chez les plantes et déterminer les mécanismes physiologiques impliqués dans la tolérance à l'As, deux espèces végétales, *S. nigrum* et *V. faba*, ont été cultivées en solution hydroponique enrichie avec différentes concentrations en As inorganique (As(III) ou As(V)). La tolérance de *S. nigrum* à la pollution en ETM, notamment en As, et la sensibilité de *V. faba* au stress métallique, ont été mises en évidence dans la première partie de ce travail. De plus, la sensibilité de *V. faba* au stress abiotique, notamment à la pollution des sols par des ETM ou des composés organiques, a été observée par plusieurs auteurs (Ma *et al.*, 2005 ; Pourrut, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2010). Cette sensibilité a amené à utiliser les réponses de cette espèce comme éléments indicateurs de l'état d'un milieu ou pour l'étude des mécanismes de toxicité des polluants. Le choix de ces deux espèces pour l'étude des mécanismes de tolérance des plantes à l'As a été fait selon plusieurs critères :

- Leur comportement vis-à-vis de l'As ;
- Une bonne adaptation à la culture hydroponique ;
- Une biomasse végétale importante permettant d'obtenir suffisamment de matériel végétal pour les analyses.

1. Absorption et stockage de l'arsenic par les plantes

La Figure III.40 présente les teneurs en As dans les racines et les feuilles des plantes cultivées en solution hydroponique enrichie en arsénite et en arséniate.

En présence d'As(III) (Figures III.40a,c), *V. faba* accumule l'As dans les racines proportionnellement à la concentration en As(III) dans la solution. En effet, les teneurs mesurées dans les tissus racinaires augmentent avec les teneurs en As(III) dans la solution. Au contraire, l'accumulation de l'As dans les feuilles chez cette espèce n'est pas corrélée avec les teneurs en arsénite dans la solution. De même, l'accumulation de l'As dans les racines de *S. nigrum* augmente avec les concentrations d'arsénite dans la solution et semble atteindre une valeur seuil proche de 1 200 mg.kg⁻¹. Les teneurs en As mesurées dans les feuilles de *S. nigrum* augmentent avec les teneurs en As(III) dans la solution, excepté pour de faibles concentrations en arsénite (25 µmol.L⁻¹).

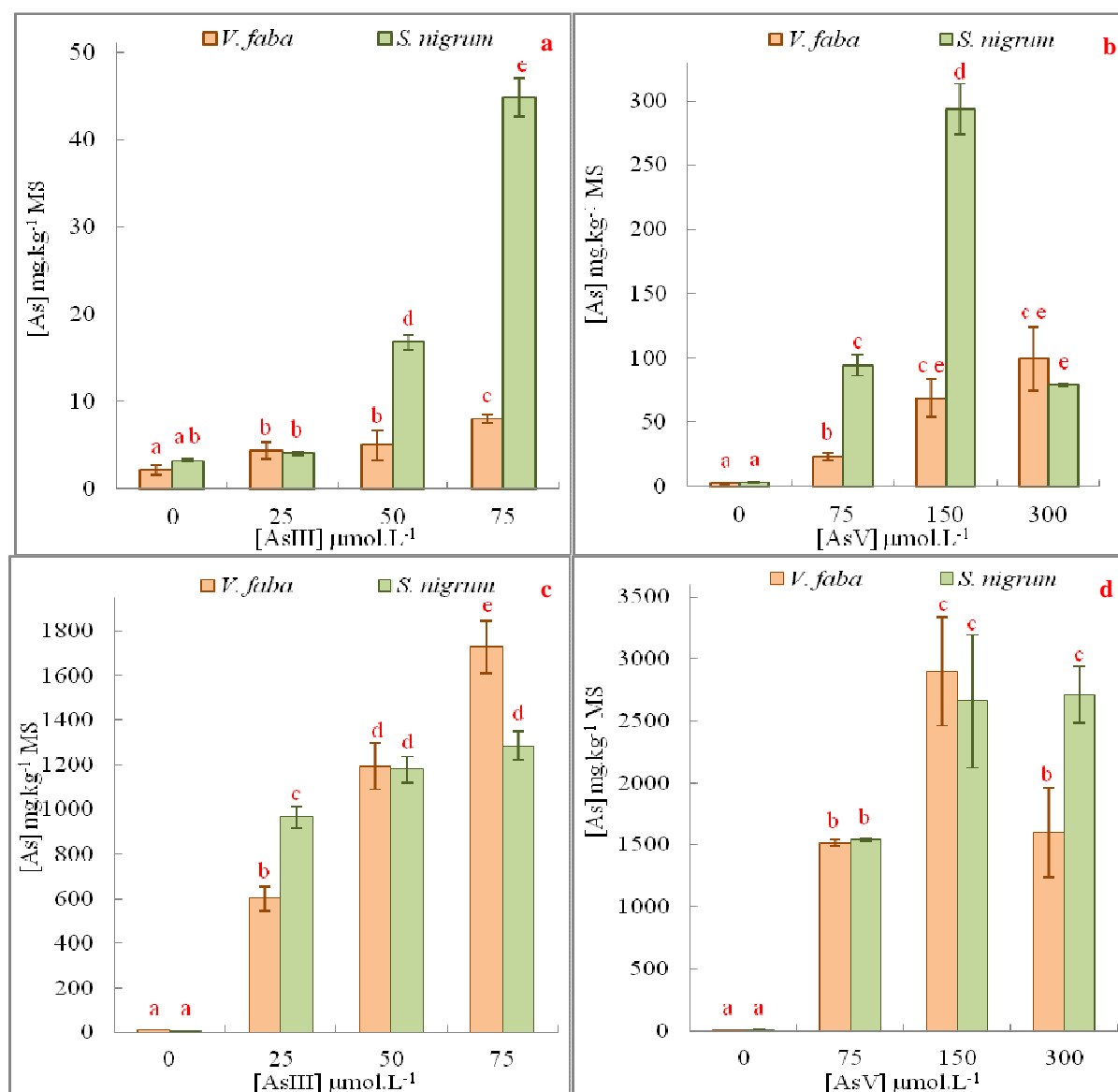


Figure III.40 : Teneurs en As dans les feuilles (a,b) et les racines (c,d) de *V. faba* et *S. nigrum* après 14 jours de culture en solution hydroponique en présence d'As(III) ou d'As(V) (n = 5, les différentes lettres indiquent les groupes significativement différents, ANOVA, p < 0,05).

En présence d'arséniate (Figure III.40b,d), l'accumulation d'As dans les racines augmente avec les teneurs dans la solution chez les deux espèces végétales. Elle semble atteindre une valeur seuil chez *S. nigrum* autour de 2 700 mg.kg⁻¹, elle est réduite chez *V. faba* aux fortes teneurs en As(V) dans la solution hydroponique (300 μmol.L⁻¹). De même, les teneurs en As mesurées dans les feuilles augmentent avec les concentrations en arséniate dans la solution, excepté en présence de 300 μmol.L⁻¹ d'As(V). Pour ces fortes teneurs, l'accumulation de l'As dans les feuilles de *V. faba* n'est pas significativement différentes de celle observée pour 150 μmol.L⁻¹ d'As(V) dans la solution, elle est réduite chez *S. nigrum*.

Ainsi, la capacité d'absorption semble se stabiliser autour d'une valeur seuil en As pour *S. nigrum*, avec une valeur moyenne dans la plante proche de 650 mg.kg⁻¹ MS en présence d'arsénite et atteignant 1 400 mg.kg⁻¹ en présence d'arséniate.

D'autre part, l'absorption de l'As(III) et de l'As(V) ne se fait pas de façon similaire chez les deux espèces végétales. En effet, en présence de 75 µM d'As(III) ou d'As(V) dans la solution, *V. faba* accumule respectivement 897 et 770 mg.kg⁻¹ d'As en moyenne dans la plante contre 666 et 816 mg.kg⁻¹ d'As pour *S. nigrum*. Par ailleurs, chez les deux espèces, l'As(V) semble faciliter le transfert de l'As absorbé vers les feuilles. En effet, une plus forte concentration d'As est mesurée dans les feuilles d'individus cultivés en présence d'arséniate.

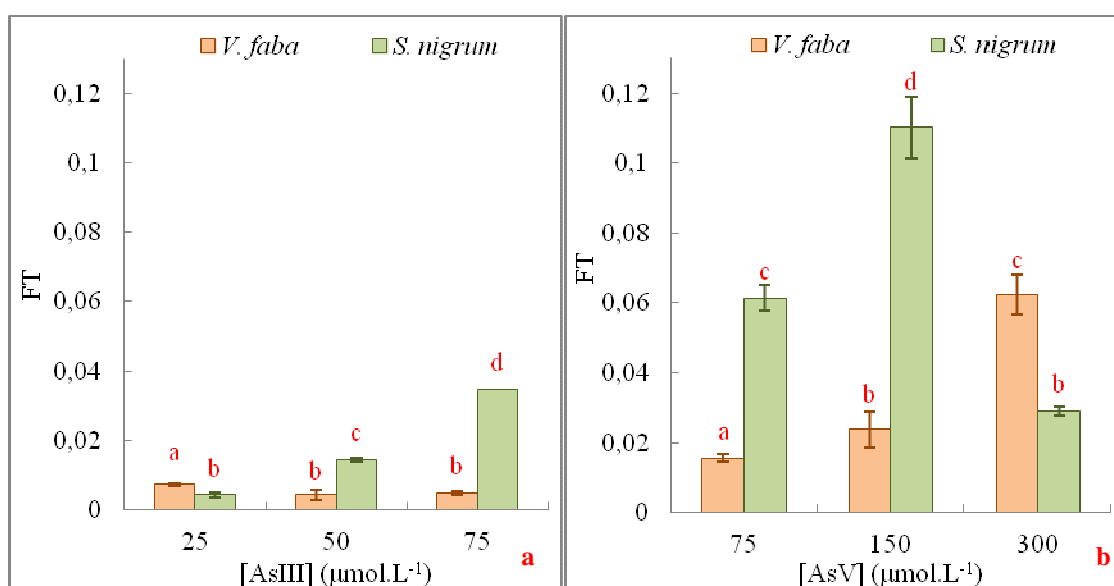


Figure III.41 : Facteur de Translocation (FT) de l'As entre les racines et les feuilles des deux espèces végétales, *S. nigrum* et *V. faba* en présence (a) d'As(III) ou (b) d'As(V), (n = 5, les différentes lettres indiquent les groupes significativement différents, ANOVA, p < 0,05).

La Figure III.41 permet d'évaluer le transfert de l'As vers les parties aériennes de ces plantes. En présence d'As(III) dans la solution (Figure III.41a), le FT mesuré chez *V. faba* varie légèrement avec les teneurs en arsénite, il reste inférieur à 0,01. Au contraire, le FT chez *S. nigrum* met en évidence une augmentation du transfert de l'As vers les parties aériennes avec les teneurs en As(III) apportées dans la solution. Cette évolution du FT avec les teneurs en As dans la solution est également observée chez les deux espèces cultivées en présence d'As(V) (Figure III.41b). Cependant, les teneurs élevées en As(V) (300 µM) ont entraîné une diminution du transfert de l'As vers les feuilles de *S. nigrum*, le FT calculé pour cette condition est fortement diminué. Par ailleurs, pour des teneurs en As(III) et en As(V) dans la

solution égales à 75 μM , le FT chez les deux espèces est plus faible en présence d'As(III). Il est presque deux fois moins important chez *S. nigrum*, et presque quatre fois moins important chez *V. faba*. Ainsi, les faibles valeurs du FT mesurées dans les différentes conditions de culture montrent que l'As est majoritairement stocké dans les racines de ces plantes, le transfert de l'As vers les feuilles étant négligeable.

2. Evaluation de la toxicité de l'arsenic vis-à-vis des deux espèces végétales

2.1. Impact de l'arsenic sur la croissance et le développement des plantes

Un des critères de toxicité des ETM sur la végétation est l'apparition d'altérations macroscopiques morphologiques ou tissulaires (Rzepka et Cuny, 2008). L'observation du développement des espèces végétales en fonction de la forme et des teneurs en As inorganique peut donc renseigner sur la phytotoxicité des différentes formes de l'As ainsi que sur la tolérance de ces deux espèces végétales aux formes inorganiques de l'As.

Le développement de la biomasse végétale de ces deux espèces est perturbé par la présence de l'As inorganique (Figure III.42). En effet, une réduction significative de la biomasse aérienne et racinaire de *S. nigrum* est observée en présence d'As(V) pour des teneurs supérieures ou égales à 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. La perte de biomasse est de 27,8 % pour les parties aériennes et de 43,5 % pour les tissus racinaires. Une diminution de plus de 50 % de la biomasse racinaire est mesurée pour des individus cultivés dans des solutions très enrichies en As(V) ($[\text{As(V)}] = 300 \mu\text{mol.L}^{-1}$). *S. nigrum* présente une altération de sa croissance pour des teneurs en arsénite supérieures ou égales à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. L'As inorganique a un impact plus marqué sur le développement de *V. faba*. En effet, celle-ci présente une réduction significative de sa biomasse aérienne et racinaire pour des teneurs en As(V) dans la solution hydroponique supérieures ou égales à 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, avec des pertes de biomasse de 33,8 % pour les parties aériennes et 30,3 % pour les racines. Pour des concentrations supérieures ou égales à 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'As(V), la perte de biomasse pour *V. faba* est supérieure à 50 % que ce soit sur les parties aériennes ou racinaires. De même, une réduction de plus de 50 % de la biomasse végétale de *V. faba* est observée lors de la culture de cette espèce en solution hydroponique contenant 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'arsénite. La perte de biomasse pour cette espèce est aussi mesurée pour de faibles quantités d'arsénite ($[\text{As(III)}] = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). L'As inorganique, quel que soit son degrés d'oxydation, altère donc fortement le développement de *V. faba*.

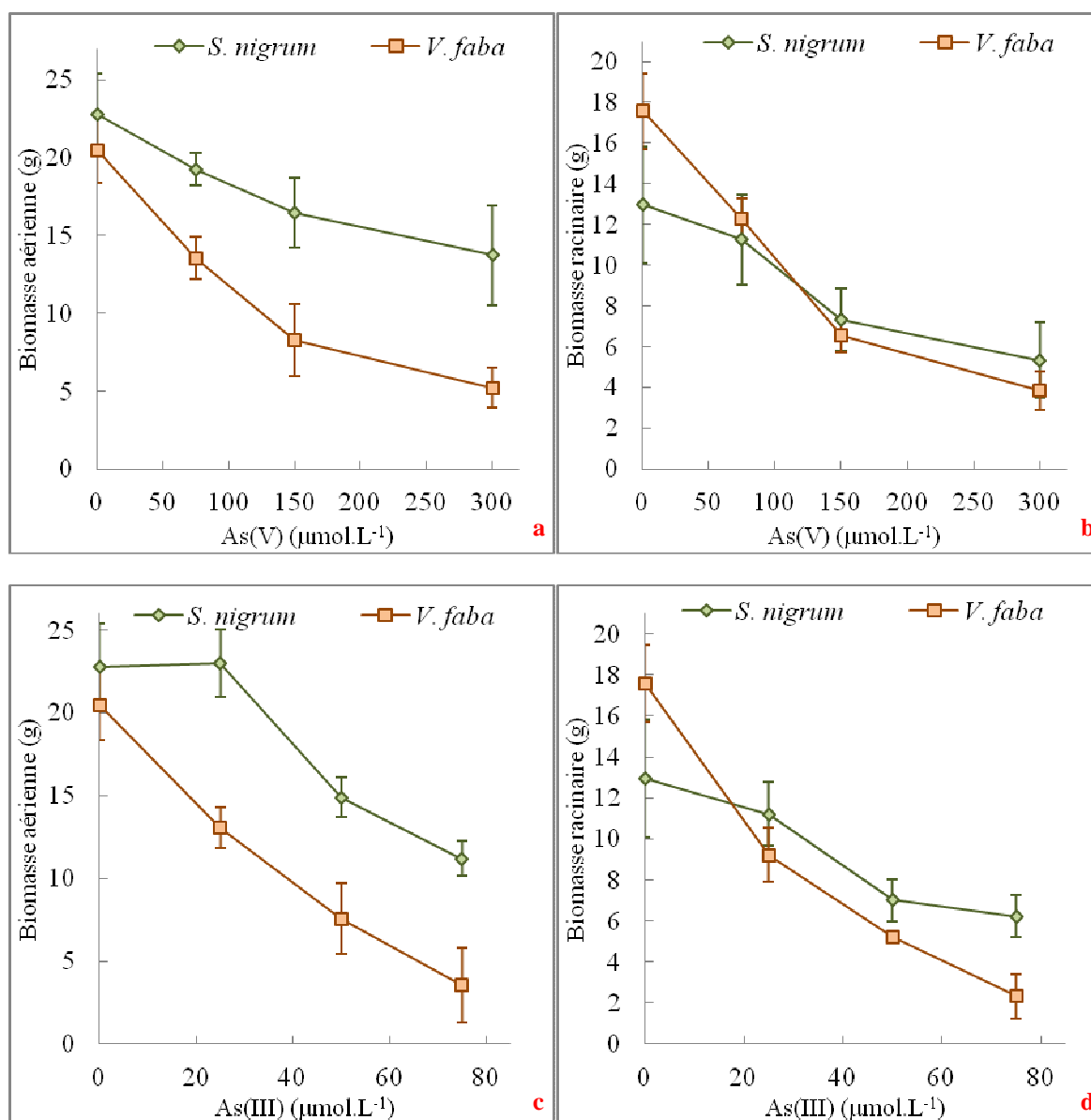


Figure III.42 : Biomasse aérienne et racinaire de *S. nigrum* et *V. faba* cultivées en solution hydroponique enrichie en As(III) et As(V), (a) Biomasse aérienne stress As(V), (b) Biomasse racinaire stress As(V), (c) Biomasse aérienne stress As(III), (d) Biomasse racinaire stress As(III), (n = 5).

Ces résultats confirment une grande sensibilité de *V. faba* à l'As inorganique, sous la forme As(V) et As(III). Le développement de *S. nigrum* est inhibé seulement pour de fortes teneurs en As inorganique, supérieures à 150 μM pour l'As(V) et 50 μM pour l'As(III). De plus, lors du stress As, l'inhibition du développement des racines chez les deux espèces végétales est plus importante que celui de la biomasse aérienne.

Par ailleurs, la culture de ces plantes dans des solutions enrichies en As met en avant une plus grande toxicité de l'arsénite par rapport à l'arséniate. En effet, pour des teneurs en

As(III) égales à 75 μM , les pertes de biomasse des deux espèces végétales sont supérieures à celles observées en présence d'As(V) à la même concentration.

2.2. Effet de l'arsenic sur l'activité photosynthétique de ces espèces

La phytotoxicité de l'As peut être la cause d'une inhibition importante de l'activité photosynthétique. Les effets de l'As sur l'activité physiologique des plantes dépendent de plusieurs paramètres :

- La forme et la teneur en As dans le substrat de culture ;
- L'espèce végétale considérée et sa capacité à tolérer l'As.

Cette étude est réalisée pour tenter de déterminer les structures cellulaires et protéiques altérées par l'As et responsables d'une inhibition du processus de la photosynthèse.

De fait, une étude des teneurs en pigments accompagnée de la mesure des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne ont été réalisées en fonction de la teneur et de la forme de l'As dans la solution hydroponique sur les deux espèces végétales étudiées. Par ailleurs, la réalisation de courbe de saturation en CO_2 et en intensité lumineuse ont été effectuées.

2.2.1. Impact de l'arsenic sur les teneurs en pigments

La Figure III.43 présente les teneurs en chlorophylles *a* et *b* et caroténoïdes mesurées dans les feuilles de *S. nigrum* et *V. faba* cultivées en solution hydroponique enrichie en arséniate ou en arsénite.

L'étude de la réponse de ces deux espèces végétales à l'As inorganique montre qu'une exposition prolongée (14 jours) de *V. faba* à une concentration supérieure ou égale à 25 μM d'AsIII entraîne une réduction significative des teneurs en pigments (Chl *a* et *b* et caroténoïdes, Figure III.43). Cette réduction est supérieure à 50 % pour les caroténoïdes et les Chl *a* lorsque les individus de *V. faba* sont exposés à 75 μM d'AsIII. De même, en présence d'AsV et pour des concentrations supérieures ou égales à 75 μM , les teneurs en pigments mesurées chez *V. faba* sont réduites significativement. Cependant, lors de la culture de *V. faba* dans une solution hydroponique contenant 150 μM d'AsV, les teneurs en Chl *b* et en caroténoïdes présentent de fortes variations entre les individus d'une même condition ce qui empêche une lecture efficace du test statistique ANOVA.

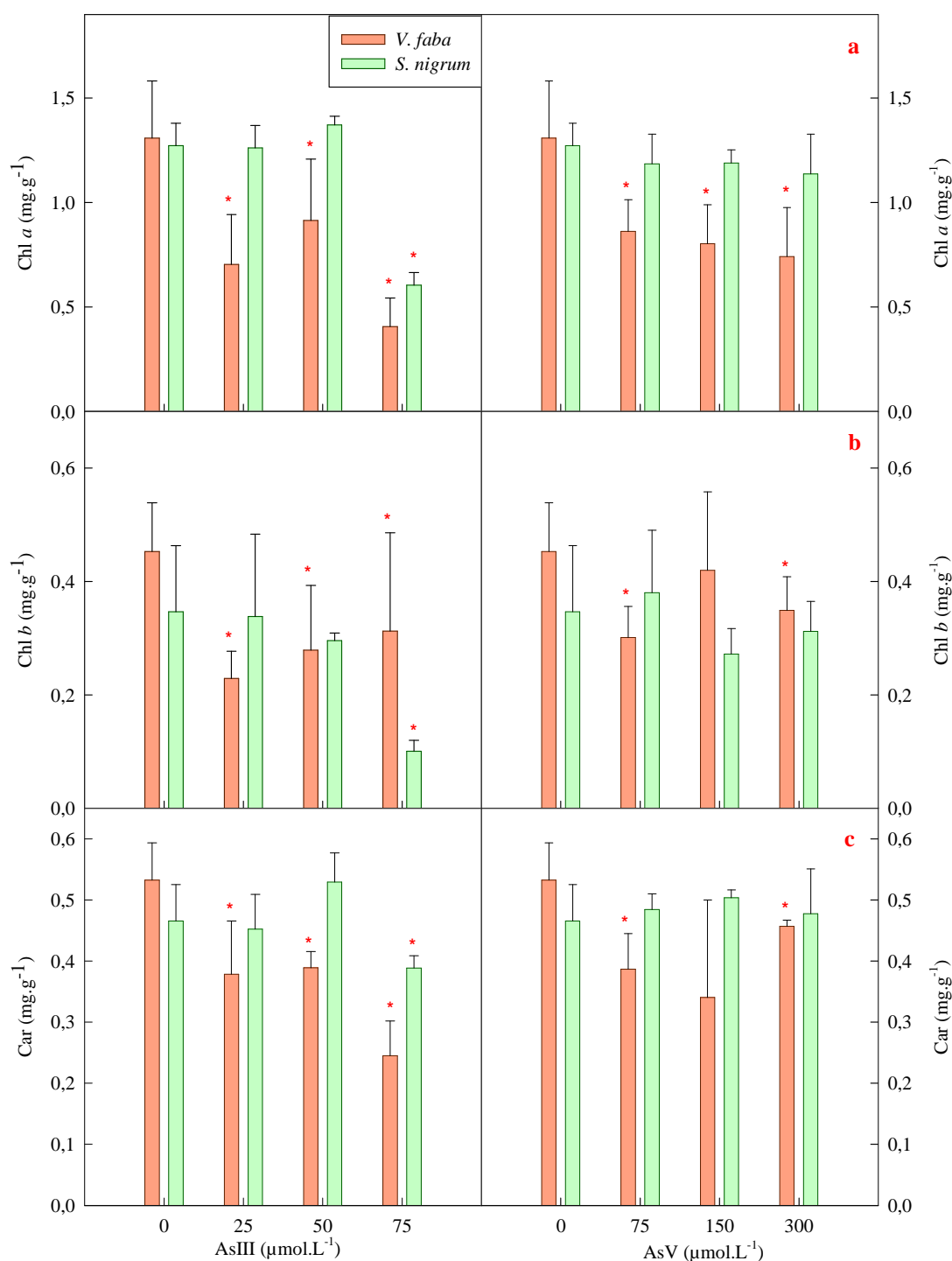


Figure III.43 : Teneurs en chlorophylles *a* et *b* (graphe a et b), et en caroténoïdes (c) chez *V. faba* et *S. nigrum* cultivées en solution hydroponique enrichie en As inorganique, (n = 5, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, p < 0,05).

S. nigrum est moins sensible que *V. faba* à l'As inorganique. En effet, la présence d'AsV n'entraîne pas de modification significative des teneurs en pigments (Chl *a* et *b* et

caroténoïdes). Cependant, l'exposition aux fortes teneurs en AsIII (AsIII = 75 μM) est responsable d'une diminution significative de l'ensemble des pigments étudiés.

La diminution des teneurs en pigments mesurées à différentes concentrations implique que l'As inorganique induit un stress plus ou moins marqué chez les deux espèces végétales. Par ailleurs, ces résultats confirment la grande sensibilité de *V. faba* à l'As inorganique, observations corrélées à celles réalisées lors de la culture de cette espèce sur des sols fortement pollués aux ETM dont l'As.

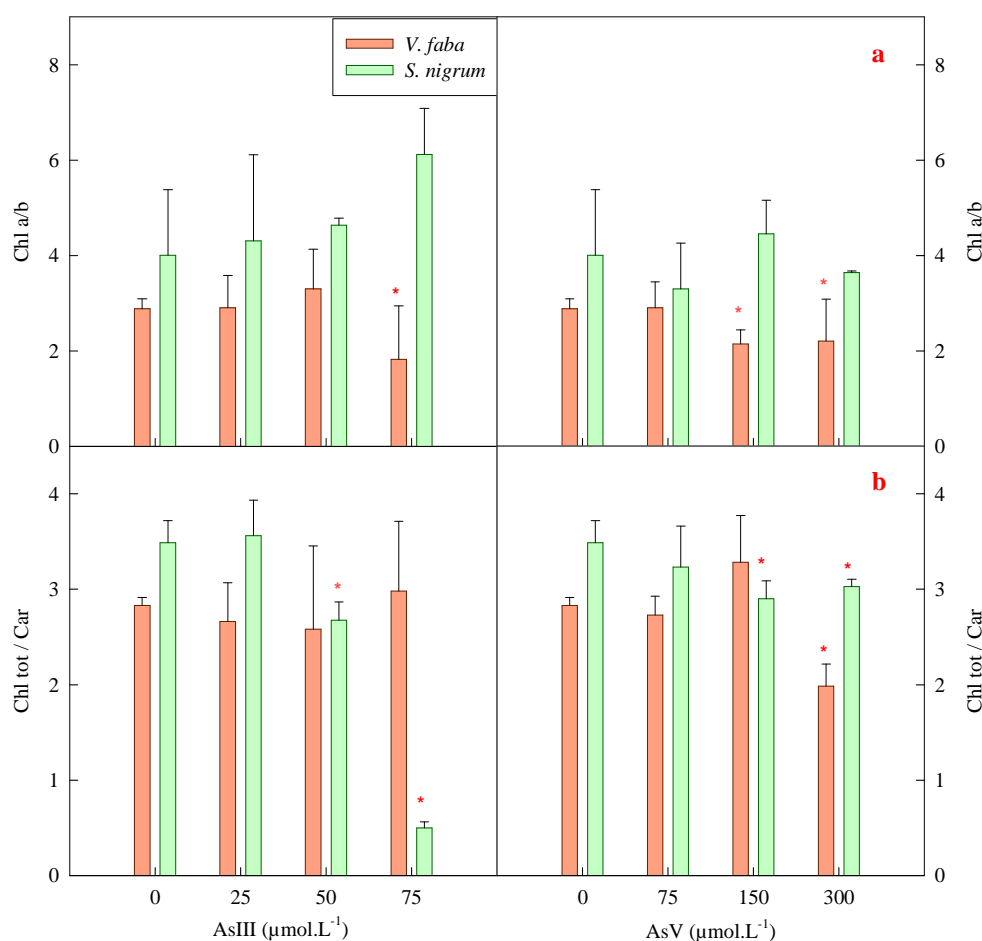


Figure III.44 : Evolution du rapport Chl a/b et Chl tot/Car chez *V. faba* et *S. nigrum* cultivées en solution hydroponique enrichie en As inorganique (n = 5, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, $p < 0,05$).

Dans les conditions contrôles, le rapport Chl a/b, représenté dans la Figure III.44a, est de 4,0 et de 2,9 respectivement pour *S. nigrum* et *V. faba*. De fait, les chlorophylles a sont 4 fois plus concentrées que les chlorophylles b chez *S. nigrum* et presque 3 fois plus concentrées chez *V. faba*. Aucune variation significative de ce rapport n'est observée en

présence d'As inorganique chez *S. nigrum*. Au contraire, pour des teneurs élevées d'arsénites (75 μM) et d'arséniates (150 μM), le rapport Chl *a/b* diminue significativement chez *V. faba*. La chlorophylle *a* semble donc plus sensible que la chlorophylle *b* au stress As.

Par ailleurs, quel que soit les conditions de culture, le rapport Chl tot/Car met en évidence une concentration en chlorophylles totales supérieure à celle des caroténoïdes (Figure III.44b). En condition contrôle, le rapport est égal à 2,8 et 3,5 respectivement pour *V. faba* et *S. nigrum*. Une réduction significative de ce rapport est observée à partir de 50 μM d'arsénite et 150 μM d'arséniate chez *S. nigrum*, alors que les teneurs en chlorophylles *a* et *b* et caroténoïdes chez cette espèce sont impactées qu'en présence de 75 μM d'arsénite. En ce qui concerne *V. faba*, seules les teneurs élevées en arséniate (300 μM) dans la solution hydroponique entraînent une diminution significative du rapport Chl tot/Car, variations qui caractérisent une réduction plus importante des pigments chlorophylliens par rapport aux caroténoïdes pour cette condition de culture.

2.2.2. Effet de l'arsenic sur le fonctionnement des photosystèmes

La Figure III.45 présente les paramètres de la fluorescence de la chlorophylle *a* (F_v/F_m , ΦPSII , F_0 et F_m) de *S. nigrum* et *V. faba* permettant d'évaluer les effets engendrés par l'As sur la capacité et l'efficacité des photosystèmes à convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique.

La fluorescence minimale des plantes à l'obscurité (F_0 , Figure III.45a) correspond à l'intensité de la fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts (quinones oxydées). Elle est faiblement impactée par l'As inorganique chez *S. nigrum*, seules les teneurs élevées en arsénite ($\text{As(III)} > 50 \mu\text{M}$) augmentent significativement la perte d'énergie par fluorescence chez cette espèce. La présence d'arsénite dans la solution hydroponique est responsable d'une augmentation significative d'au moins 50 % de F_0 chez *V. faba*. Il en est de même pour une concentration d'arséniate supérieure ou égale à 150 μM .

La fluorescence maximale des plantes à l'obscurité (F_m) correspond à l'intensité de fluorescence quand tous les centres réactionnels du PSII sont fermés (Figure III.45b). Seul l'arsénite affecte la fluorescence maximale des plantes à l'obscurité. En effet, elle augmente significativement chez *V. faba* pour des teneurs en As(III) supérieures ou égales à 25 μM , elle est réduite significativement chez *S. nigrum* à partir de 50 μM d' As(III) .

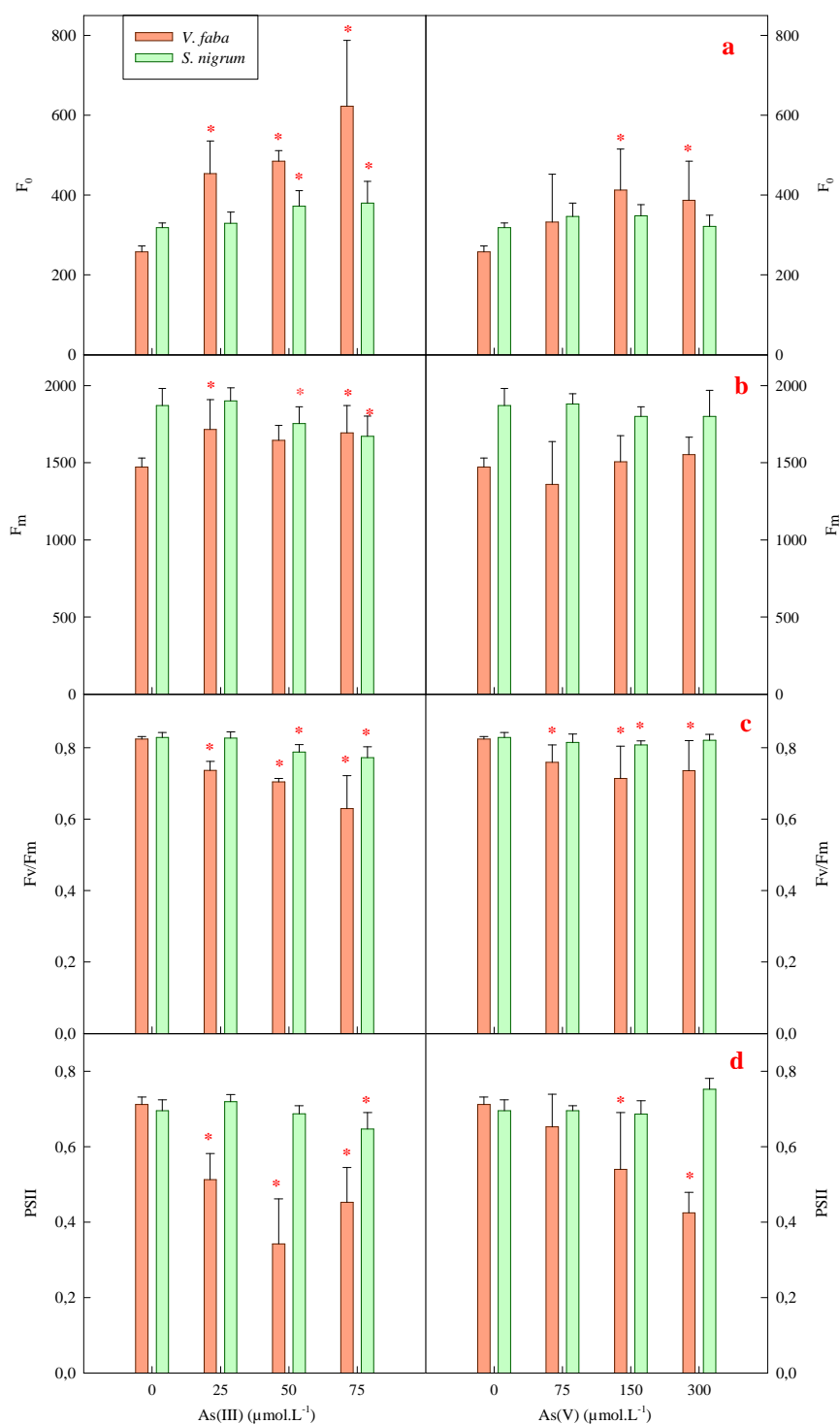


Figure III.45 : Paramètres de fluorescence de la chlorophylle *a* mesurés chez *S. nigrum* et *V. faba* cultivées en solution hydroponique enrichie en AsIII et AsV. Représentation de la fluorescence minimale à l'obscurité (F_0 , a), de la fluorescence maximale à l'obscurité (F_m , b), de l'efficacité photochimique maximale des PSII (F_v/F_m , c) et du rendement de l'efficacité photochimique du PSII (Φ_{PSII} , d) ($n = 5$, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, $p < 0,05$).

La différence de fluorescence ($F_m - F_0$) est appelée fluorescence variable (F_v). Elle correspond à la mesure de la fraction de l'énergie photonique absorbée convertible en énergie chimique (Farineau et Morot-Gaudry, 2011). L'évolution de F_0 et F_m en présence d'As inorganique met en évidence une réduction de l'énergie photonique absorbée chez *V. faba* en présence d'arséniate et lorsque la teneur en arsénite dans la solution nutritive est supérieure ou égale à 50 μM . L'absorption d'énergie photonique chez *S. nigrum* est réduite dans une seule condition, lorsque la concentration en As(III) atteint 75 μM . A partir de la fluorescence variable, le rendement quantique maximum de la réaction photochimique des PSII (F_v/F_m) est calculé.

Les Figures III.45c,d mettent en évidence une inhibition des fonctions du PSII chez *V. faba*. En effet, la présence de l'arsénite, même à faible concentration (25 μM d'AsIII), affecte le rendement photochimique des PSII, décrit par les variables F_v/F_m et ΦPSII . Ces résultats impliquent que, d'une part, l'arsénite altère l'efficacité photochimique des PSII et leur aptitude à réduire l'accepteur primaire Q_A (déterminés par le rapport F_v/F_m), et d'autre part, est responsable d'une réduction de la proportion d'énergie absorbée par les chlorophylles *a* liées au PSII, phénomène caractérisé par une diminution de la variable ΦPSII . Les mesures réalisées sur *S. nigrum* montrent un faible impact de l'As sur le fonctionnement des PSII. En effet, seul l'As(III) à forte concentration (75 μM) inhibe le rendement des photosystèmes (ΦPSII). Une réduction significative du rapport F_v/F_m de *S. nigrum* est aussi observée à partir de 50 μM d'As(III) et en présence de 150 μM d'As(V).

L'activité des photosystèmes est donc principalement altérée en présence d'As(III) dont la phytotoxicité est plus marquée que pour l'As(V). Chez *V. faba*, l'As semble agir préférentiellement sur la capacité des chlorophylles *a* liées au PSII à absorber l'énergie lumineuse, caractérisée par une réduction importante de ΦPSII suite à un stress As.

2.2.3. Effet de l'arsenic sur les échanges gazeux

Pour mieux évaluer l'impact de l'As au niveau de l'activité photosynthétique des plantes, les échanges gazeux ont été mesurés au niveau des feuilles 24 h avant la récolte des plantes (Figure III.46) et parallèlement aux mesures des paramètres de fluorescence de la chlorophylle *a*.

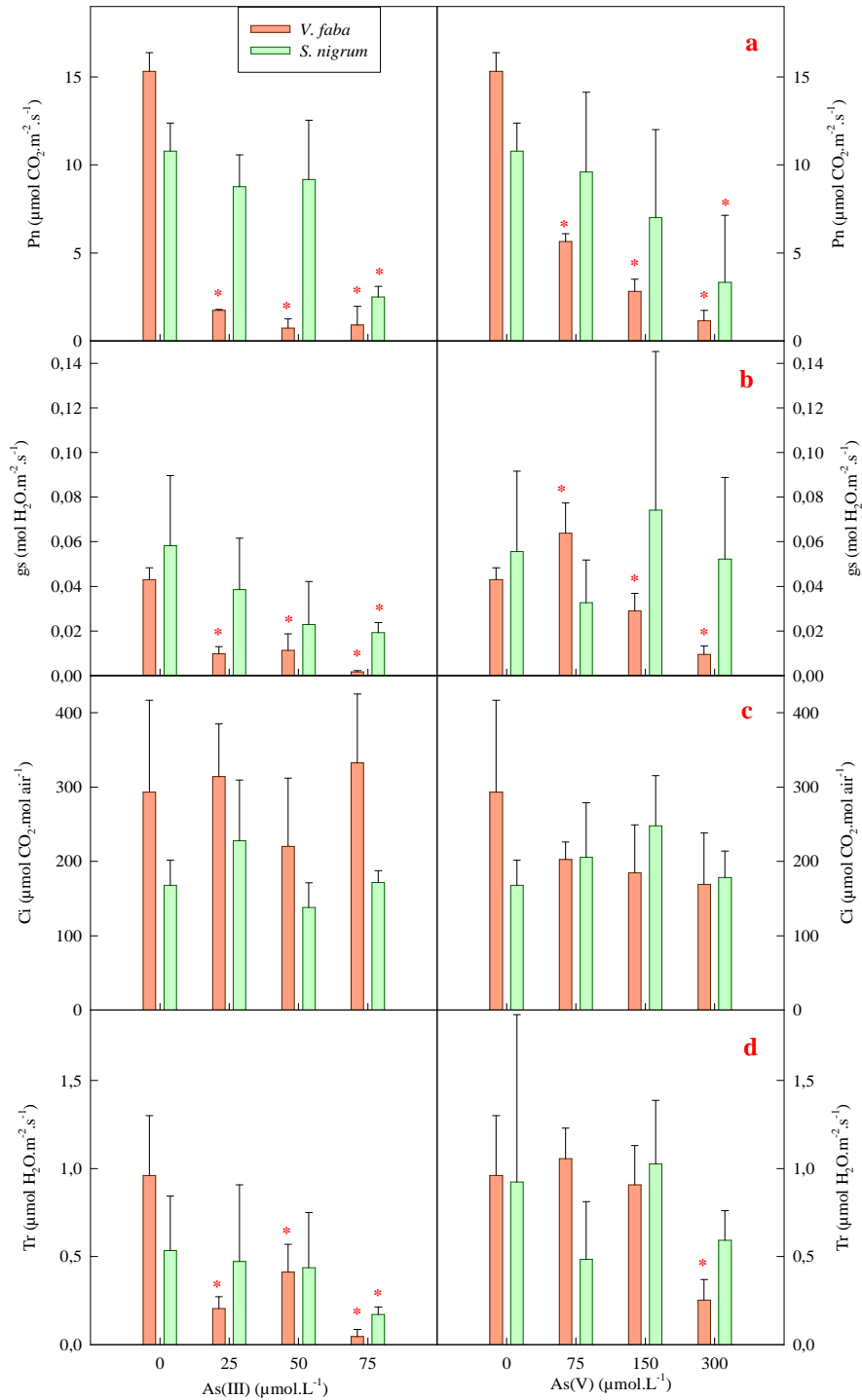


Figure III.46 : Mesure des échanges gazeux au niveau des feuilles pour les 2 espèces végétales cultivées en solution hydroponique enrichie en As inorganique, (a) photosynthèse nette (Pn), (b) conductance stomatique (gs), (c) concentration intercellulaire en CO_2 (Ci), (d) transpiration (Tr), ($n = 5$, *) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, $p < 0,05$).

Les résultats montrent une réduction significative du taux d'assimilation nette du CO₂ (Pn) chez *V. faba* en présence d'As inorganique et ce quel que soit son degré d'oxydation ou les concentrations apportées (Figure III.46a). Cette réduction est couplée à une diminution significative de la conductance stomatique (gs) et de la transpiration (excepté pour des teneurs en As(V) inférieures à 150 µM) limitant le flux hydrique dans la plante (Figure III.46b,d). Cependant, malgré une réduction de gs, la concentration en CO₂ intercellulaire ne varie pas significativement, elle est comprise entre 169 et 332,7 µmol CO₂.mol air⁻¹ (Figure III.46c).

S. nigrum, dont le fonctionnement des photosystèmes est moins impacté que chez *V. faba*, présente une réduction significative du taux de photosynthèse nette lors de la culture des individus dans des solutions hydroponiques très enrichies en As(V) (300 µmol.L⁻¹) ou en As(III) (75 µmol.L⁻¹) (Figure III.46a). Cette réduction est accompagnée, en présence de 75 µM d'As(III), d'une diminution significative de la conductance stomatique et de la transpiration (Figure III.46b,d).

L'As inorganique a donc une influence sur la capacité des plantes à assimiler le CO₂, notamment chez *V. faba*. Par ailleurs, il influe sur les flux hydriques au sein de la plante perturbant l'absorption et le transport des nutriments et donc *in fine* le développement des plantes.

2.2.4. Evolution de l'assimilation du CO₂ par les plantes en fonction de l'intensité lumineuse et de la concentration en CO₂

2.2.4.1. Courbe de saturation lumineuse

La Figure III.47 présente les courbes de saturation lumineuse qui correspondent à l'évolution de la photosynthèse nette de *V. faba* et *S. nigrum* en fonction de l'intensité lumineuse apportée. Pour les deux espèces, l'augmentation de l'intensité de l'éclairement stimule l'assimilation du CO₂ par les plantes jusqu'à un certain seuil dépendant des conditions de culture (forme et teneur en As dans la solution hydroponique) et de l'espèce végétale considérée.

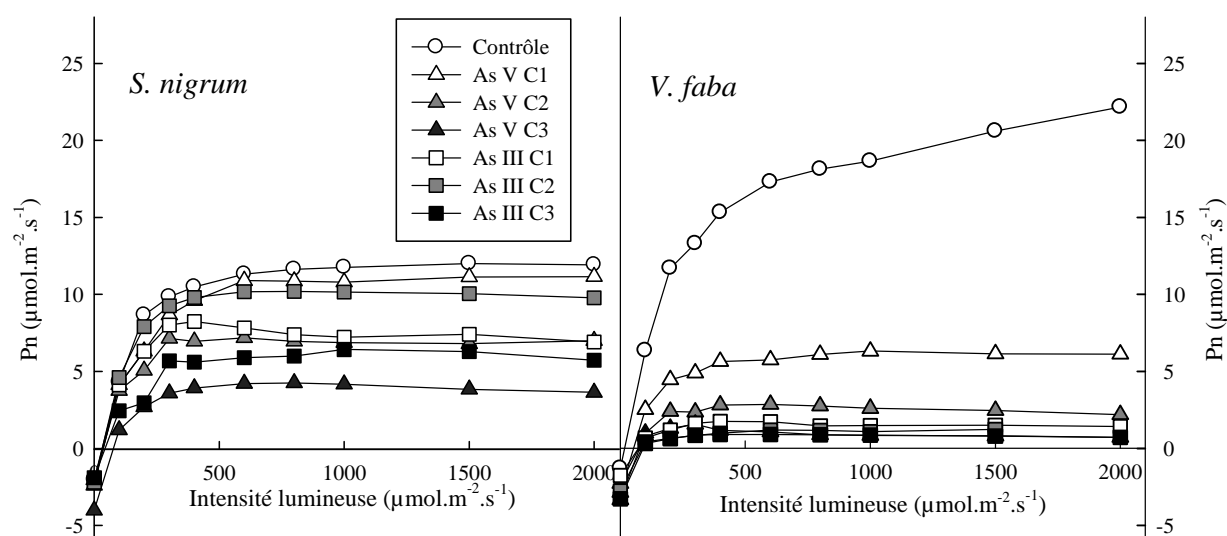


Figure III.47 : Courbes de saturation de la photosynthèse de plants de *S. nigrum* et *V. faba* en fonction de la densité du flux de photons (de 0 à 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) après 14 jours de stress As. La teneur en CO_2 est maintenue à 360 ppm et la température à 20 °C (n = 5).

A partir de ces courbes de saturation lumineuse, certains paramètres photosynthétiques relatifs au fonctionnement des PSII sont présentés dans le Tableau III.19. En effet, ces courbes permettent de mesurer indirectement la respiration à l'obscurité (R_d) assimilée à la respiration mitochondriale. De même, elles permettent d'évaluer le point de compensation lumineux (Γ) qui caractérise l'intensité lumineuse nécessaire pour que l'assimilation de CO_2 compense juste la respiration ($P_n = 0$). L'éclairement saturant (I_s) ou optimal correspond à l'intensité lumineuse permettant d'obtenir le taux maximal d'assimilation nette du CO_2 ($P_n \text{ max}_{\text{PPFD}}$). Au-delà de cette valeur, la capacité d'absorption des photons dépasse la capacité de leur utilisation. Les réactions d'assimilation du CO_2 deviennent limitantes et la photosynthèse présente une intensité maximale. Enfin, dans la partie linéaire de la pente, la lumière est limitante, le coefficient directeur de cette pente détermine le rendement de l'absorption des photons appelé le rendement quantique foliaire de la fixation du CO_2 (ΦCO_2).

De manière générale, une variation significative est observée pour de nombreux paramètres (R_d , Γ , $P_n \text{ max}_{\text{PPFD}}$ et ΦCO_2) liés à l'activité photosynthétique de *V. faba*. En effet, la respiration à l'obscurité de *V. faba* augmente avec la teneur en As(III) et As(V) dans la solution hydroponique. Ces variations sont significatives par rapport aux conditions témoins à partir d'un apport de 50 μM d'arsénite et 75 μM d'arséniate. De même, une augmentation significative de l'intensité de compensation (Γ) est observée à partir de 25 μM d'As(III) et

75 μM d'As(V). L'As a donc un impact important sur l'efficacité photosynthétique de *V. faba*. Par ailleurs, la sensibilité de *V. faba* à l'As est caractérisée par une forte diminution de l'assimilation nette maximale de CO_2 ($\text{Pn}_{\text{maxPPFD}}$), elle est au moins onze fois plus faible en présence d'As(III) et de trois à treize fois plus faible en présence d'As(V). Enfin, le rendement quantique de la fixation du CO_2 (ΦCO_2) de *V. faba* est altéré en présence d'arsénite et d'arséniate même à de faibles concentrations dans la solution hydroponique. Seule l'intensité saturante ne présente pas de variation significative en présence d'As inorganique. D'autre part, dans certaines conditions de culture, l'éclairement supérieur à 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ entraîne une légère diminution de la photosynthèse nette décrit par le calcul des coefficients directeurs présentés dans la Tableau III.20. Ce phénomène, observé pour des teneurs en As(III) de 25 μM et de 75 μM ainsi qu'en présence d'As(V) traduit une légère photoinhibition à ces niveaux d'éclairement (Bigot *et al.*, 2007). Ces résultats confirment les fortes perturbations engendrées par l'As au niveau de l'activité photosynthétique de cette espèce. En effet, d'après ces premiers résultats, l'action de l'As chez *V. faba* se focalise sur le fonctionnement du PSII et plus particulièrement sur sa capacité à capter l'énergie lumineuse.

L'activité photosynthétique de *S. nigrum* est moins perturbée en présence d'As inorganique. Seules les teneurs élevées en As(III) (75 μM) et en As(V) (300 μM) entraînent une augmentation significative de la respiration à l'obscurité (R_d) et de l'éclairement saturant (I_s), une inhibition de l'assimilation nette en CO_2 ($\text{Pn}_{\text{maxPPFD}}$) et une altération du rendement quantique foliaire (ΦCO_2). Le point de compensation (Γ) augmente significativement lorsque les teneurs en As(V) dans la solution hydroponique sont supérieures ou égales à 150 μM , aucune variation significative de Γ n'est observée en présence d'arsénite. Ces résultats semblent indiquer une faible action de l'As sur le fonctionnement des PSII chez *S. nigrum*, leur activité étant inhibée seulement pour des teneurs élevées en As(V) (300 μM) et en As(III) (75 μM). Cependant, le Tableau III.20 semble indiquer un phénomène de photoinhibition en présence d'As(III) et d'As(V) à fortes concentrations (300 μM). Ce phénomène est plus marqué chez *S. nigrum* que chez *V. faba*.

Par ailleurs, les résultats montrent une altération significativement plus importante de l'activité photosynthétique de *V. faba* en présence d'arsénite dans la solution hydroponique qu'en présence d'arséniate à la même concentration (As(III) C_3 = As(V) C_1 = 75 μM). Cette différence de toxicité n'est pas observée chez *S. nigrum*.

Tableau III.19 : Mesures indirectes de la respiration à l'obscurité (R_d , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du point de compensation lumineux (Γ , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de l'éclairement saturant (I_s , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du taux maximal d'assimilation nette du CO_2 ($\text{Pn max}_{\text{PPFD}}$, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et du rendement quantique de la fixation du CO_2 (ΦCO_2 , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ($n = 5$, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, $p < 0,05$).

	R_d		Γ		I_s		$\text{Pn max}_{\text{PPFD}}$		ΦCO_2	
	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>
<i>Contrôle</i>	2,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,4	31,7 \pm 2,5	17,9 \pm 3,23	450,0 \pm 129,1	500,0 \pm 115,5	11,6 \pm 2,4	20,9 \pm 3,4	0,067 \pm 0,009	0,076 \pm 0,010
<i>AsIII C₁</i>	1,9 \pm 0,8	1,6 \pm 0,5	30,3 \pm 15,1	70,1 \pm 12,1*	400,0 \pm 0,0	466,7 \pm 94,3	8,8 \pm 1,5	1,8 \pm 0,1*	0,065 \pm 0,003	0,024 \pm 0,004*
<i>AsIII C₂</i>	2,1 \pm 0,4	3,5 \pm 1,7*	34,2 \pm 4,4	81,0 \pm 23,0*	525,0 \pm 150,0	425,0 \pm 125,8	9,7 \pm 3,9	1,8 \pm 0,6*	0,060 \pm 0,005	0,035 \pm 0,011*
<i>AsIII C₃</i>	1,9 \pm 0,3	3,3 \pm 0,1*	50,9 \pm 17,1	92,3 \pm 10,8*	700,0 \pm 346,1*	375,0 \pm 50,0	4,2 \pm 1,8*	1,0 \pm 0,8*	0,042 \pm 0,014*	0,036 \pm 0,006*
<i>AsV C₁</i>	1,9 \pm 0,5	2,8 \pm 0,5*	31,0 \pm 53,4	53,4 \pm 11,5*	600,0 \pm 163,3	600,0 \pm 163,3	12,0 \pm 3,6	6,4 \pm 0,9*	0,063 \pm 0,015	0,054 \pm 0,004*
<i>AsV C₂</i>	2,3 \pm 0,6	3,3 \pm 1,3*	58,5 \pm 20,8*	75,5 \pm 10,2*	500,0 \pm 115,5	525,0 \pm 95,7	9,0 \pm 5,5	3,0 \pm 0,5*	0,051 \pm 0,021	0,043 \pm 0,012*
<i>AsV C₃</i>	3,7 \pm 1,5*	2,3 \pm 0,1*	73,4 \pm 25,2*	74,7 \pm 10,3*	600,0 \pm 0,0*	400,0 \pm 0,0	5,3 \pm 5,6*	1,6 \pm 0,6*	0,048 \pm 0,018*	0,031 \pm 0,004*

Tableau III.20 : Coefficients directeurs des courbes de saturation lumineuse de *S. nigrum* et *V. faba* lorsque l'éclairement est compris entre 1000 et 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>
Contrôle	0,00016	0,0035
C ₁ As(III) (25 μM)	-0,00029	-0,00007
C ₂ As(III) (50 μM)	-0,00038	0,00006
C ₃ As(III) (75 μM)	-0,00070	-0,00015
C ₁ As(V) (75 μM)	0,00035	-0,00019
C ₂ As(V) (150 μM)	0,00012	-0,00041
C ₃ As(V) (300 μM)	-0,00054	-0,00012

2.2.4.2. Courbe de saturation en CO₂

La Figure III.48 présente les courbes de saturation en CO₂. Elles décrivent l'évolution de la photosynthèse nette de *V. faba* et *S. nigrum* en fonction de la concentration ambiante en CO₂ comprise entre 0 et 1500 $\mu\text{mol.mol air}^{-1}$.

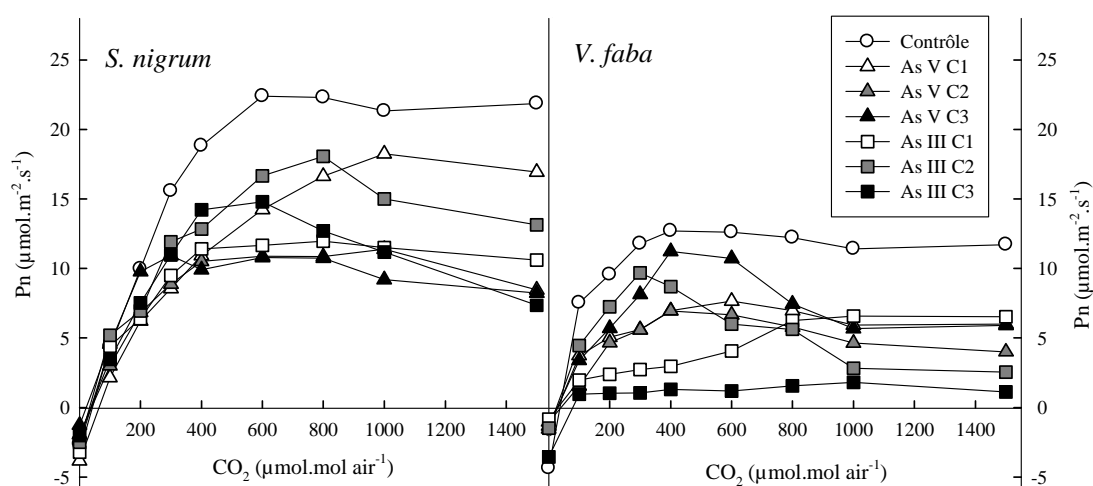


Figure III.48 : Courbe de saturation en CO₂, intensité lumineuse fixée à 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Evolution du taux de photosynthèse nette (Pn) de plants de *S. nigrum* et *V. faba* en fonction de la concentration externe en CO₂ après 14 jours de stress As, (n = 5).

De manière générale, l'évolution de ces courbes montre une augmentation proportionnelle de l'assimilation du CO₂ par *V. faba* et *S. nigrum* avec la concentration externe en CO₂ jusqu'à atteindre une valeur seuil variant en fonction des conditions de culture. Le CO₂ augmente l'activité photosynthétique en stimulant l'activité carboxylase de la Rubisco. Pour certaines conditions et en fonction de l'espèce végétale, une diminution de la photosynthèse nette est observée pour de fortes teneurs en CO₂.

De ces courbes, différents paramètres photosynthétiques relatifs à la fixation du CO₂ par la Rubisco peuvent être déduits (Tableau III.21) :

- La photorespiration (R_i) qui représente l'activité oxygénase de la Rubisco (lorsque $C_a = 0$) ;
- Le point de compensation en CO₂ (Γ^*) (lorsque $P_n = 0$) ;
- Le taux de carboxylation maximal de la Rubisco ($V_c \text{ max}$) (coefficient directeur de la partie linéaire de la courbe P_n/C_i) ;
- Le taux maximal d'assimilation nette du CO₂ ($P_n \text{ max}_{C_i}$).

Chez *V. faba*, l'apport d'As inorganique dans la solution a pour effet d'inhiber le fonctionnement de la Rubisco. En effet, la photorespiration (R_i) ainsi que la vitesse de fixation du CO₂ ($V_c \text{ max}$) diminue en présence d'As inorganique. Deux hypothèses peuvent être avancées :

- L'As inorganique inhibe les activités oxygénase et carboxylase de la Rubisco par altération du site actif des sous unités de la Rubisco (Siedlecka et Krupa, 2004 ; Mateos-Naranjo *et al.*, 2012) ;
- L'As cause une dégradation des sous-unités de la Rubisco (Duquesnoy *et al.*, 2009 ; Ahsan *et al.*, 2010).

Ce phénomène a pour conséquence une altération importante de l'assimilation du CO₂ par la plante ($P_n \text{ max}$).

De même, le taux maximal de photosynthèse nette de *S. nigrum* diminue significativement lorsque la concentration en As dans la solution de culture augmente. Cette diminution semble répondre à l'inhibition de l'activité carboxylase de la Rubisco en présence d'As(V) et de teneurs élevées en As(III). Une réduction de la photorespiration chez cette espèce est observée pour les fortes teneurs en As(V) dans la solution hydroponique (300 μM). Par ailleurs, l'As n'entraîne pas de perturbation significative du point de compensation en CO₂ (Γ^*), il varie autour de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

L'As provoque donc une inhibition de l'activité de la Rubisco au niveau de ses fonctions carboxylase et oxygénase. Cette réduction est en partie responsable de la baisse de l'activité photosynthétique des plantes en présence d'As inorganique. L'altération de l'activité photosynthétique chez *S. nigrum* est moins marquée que chez *V. faba*, elle permet ainsi à la plante de maintenir une activité photosynthétique nécessaire à son développement. Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence, comme précédemment, une toxicité plus importante de l'arsénite que de l'arséniate chez *V. faba*, qui ne se reflètent pas chez *S. nigrum*.

Tableau III.21 : Mesures indirectes de la photorespiration (R_i , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du point de compensation en CO_2 (Γ^* , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), du taux de carboxylation maximal ($V_c \text{ max}$, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et du taux maximal d'assimilation nette du CO_2 ($P_n \text{ max}_{Ci}$, $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) déterminés à partir des courbes de saturation en CO_2 réalisées à une intensité lumineuse de $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($n = 5$, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, $p < 0,05$).

	R_i		Γ^*		$V_c \text{ max}$		$P_n \text{ max}_{Ci}$	
	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>	<i>S. nigrum</i>	<i>V. faba</i>
<i>Contrôle</i>	2,63 $\pm 0,25$	3,73 $\pm 1,38$	38,00 $\pm 11,92$	35,54 $\pm 11,64$	91,95 $\pm 28,00$	105,43 $\pm 20,65$	23,28 $\pm 0,97$	17,09 $\pm 6,12$
<i>AsIII C₁</i>	2,70 $\pm 0,55$	0,87 $\pm 0,12^*$	38,28 $\pm 16,59$	48,34 $\pm 29,37$	86,62 $\pm 9,21$	41,48 $\pm 19,67^*$	13,77 $\pm 3,14^*$	8,74 $\pm 3,09^*$
<i>AsIII C₂</i>	2,51 $\pm 0,39$	1,49 $\pm 1,24^*$	38,59 $\pm 23,80$	85,63 $\pm 59,94^*$	87,23 $\pm 10,33$	62,48 $\pm 32,03^*$	18,07 $\pm 1,25^*$	9,72 $\pm 5,82^*$
<i>AsIII C₃</i>	2,02 $\pm 0,51$	2,40 $\pm 0,99^*$	44,98 $\pm 9,48$	67,70 $\pm 24,75$	51,15 $\pm 2,96^*$	42,05 $\pm 11,30^*$	14,15 $\pm 1,08^*$	2,09 $\pm 0,26^*$
<i>AsV C₁</i>	3,30 $\pm 1,33$	1,53 $\pm 0,16^*$	60,69 $\pm 22,38$	33,51 $\pm 17,04$	67,23 $\pm 6,18^*$	53,70 $\pm 16,87^*$	19,78 $\pm 2,10^*$	8,17 $\pm 1,17^*$
<i>AsV C₂</i>	2,06 $\pm 0,41$	1,16 $\pm 0,15^*$	39,87 $\pm 19,40$	38,91 $\pm 5,46$	60,70 $\pm 22,34^*$	39,82 $\pm 7,33^*$	15,33 $\pm 6,99^*$	7,96 $\pm 2,73^*$
<i>AsV C₃</i>	1,46 $\pm 0,49^*$	1,34 $\pm 0,48^*$	35,06 $\pm 17,50$	44,62 $\pm 12,85$	62,53 $\pm 24,03^*$	52,14 $\pm 17,11^*$	12,73 $\pm 2,85^*$	9,67 $\pm 6,85^*$

3. Impact de l'As sur les lipides membranaires

Les lipides membranaires apparaissent, et notamment chez les végétaux, comme des acteurs majeurs des grandes fonctions physiologiques (processus bioénergétique et photosynthétique, réponses aux stress biotiques et abiotiques, reproduction et développement...) (Le Guédard *et al.*, 2008). L'étude de la composition lipidique et de leur dégradation par peroxydation peut ainsi permettre d'évaluer l'impact de l'As sur l'activité physiologique des plantes et renseigner sur le niveau de perturbation du métabolisme de la plante.

3.1. Composition en acide gras des feuilles

Les travaux réalisés par Le Guédard *et al.* (2008, 2012) ont montré que la composition en acides gras (et plus précisément la valeur du rapport $C_{18:3}/(C_{18:0}+C_{18:1}+C_{18:2})$) des feuilles de végétaux présente les caractéristiques d'un biomarqueur métabolique d'effet et d'exposition aux ETM. Ainsi, l'utilisation chez les végétaux, des lipides foliaires comme biomarqueur de la contamination des sols par les ETM peut permettre d'évaluer la toxicité de l'As chez ces deux espèces végétales. Ce biomarqueur d'exposition a conduit à l'élaboration d'une norme AFNOR sur la qualité des sols (Le Guédard et Bessoule, Norme AFNOR X31-233, *sous presse*).

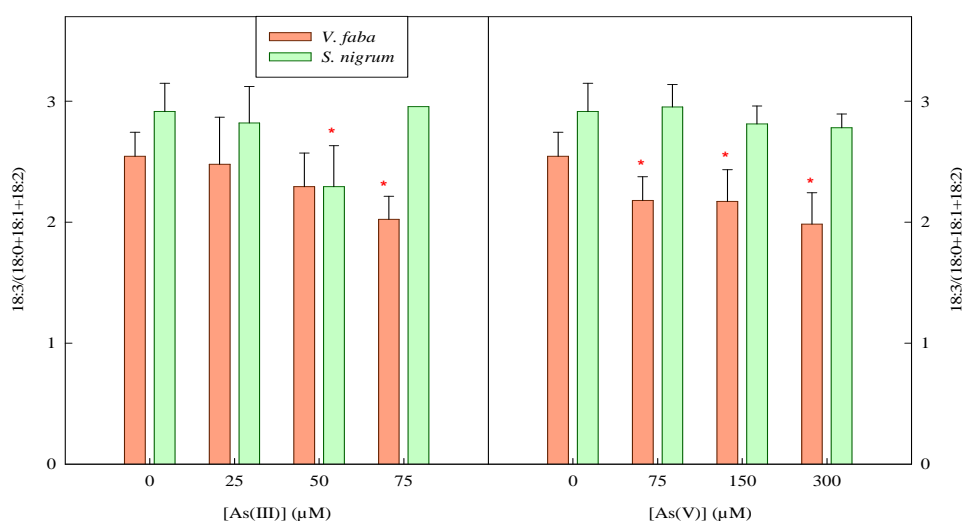


Figure III.49 : Valeurs moyennes du biomarqueur lipidique (rapport $C_{18:3}/(C_{18:0}+C_{18:1}+C_{18:2})$) dans les feuilles de *V. faba* et *S. nigrum* en fonction de la forme et de la concentration en As inorganique (n = 5, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, $p < 0,05$).

D'une part, ces résultats mettent en évidence une composition lipidique dans les feuilles de ces deux espèces végétales dominée par les acides gras polyinsaturés principalement représentés par l'acide linoléique (C18:3, Figure III.49). En effet, les acides gras polyinsaturés représentent plus de 70 % des acides gras des feuilles chez les deux espèces végétales en condition contrôlée (75 et 72 % respectivement pour *V. faba* et *S. nigrum*), l'acide linoléique représentant à lui seul environ 55 % de l'ensemble des lipides.

D'autre part, la proportion d'acide linoléique (C18:3) dans les feuilles de *V. faba* diminue significativement en réponse à une augmentation des teneurs en As dans la solution hydroponique, en particulier en présence d'arséniate. A l'inverse, une augmentation de la proportion de l'acide linoléique (C18:2), de l'acide oléique (C18:1) et des acides gras stéariques (C18:0) avec les teneurs en As inorganique est observée chez cette même espèce. De même, une augmentation significative de la proportion en acide linoléique a été relevée chez *S. nigrum* pour des teneurs en arsénite de 50 μ M. De fait, l'évolution du biomarqueur lipidique (rapport C18:3/(C18:0+C18:1+C18:2), Figure III.49) lors d'un stress arsénié montre une réduction significative de celui-ci en présence d'arséniate faiblement concentré (à partir de 75 μ M) et pour des teneurs de 75 μ M d'arsénite dans la solution hydroponique chez *V. faba*. Dans les feuilles de *S. nigrum*, les variations observées du biomarqueur lipidique ne sont pas significatives exceptées pour une condition, en présence de 50 μ M d'arsénite. La réduction du rapport C18:3/(C18:0+C18:1+C18:2) semble ainsi indiquer un impact plus marqué de l'As sur les teneurs d'acides gras tri-insaturés (C18:3). Des résultats similaires ont été observés dans des feuilles de plantules de colza traitées au Cd (Ben Youssef *et al.*, 2005). Par ailleurs, ces résultats montrent un impact plus marqué de l'As sur la composition lipidique des feuilles de *V. faba*, qui confirme une grande sensibilité de cette espèce à l'As.

3.2. Mesure de la peroxidation des lipides membranaires

L'étude de la peroxidation lipidique donne des informations complémentaires sur l'état des lipides membranaires des feuilles. Ceux-ci jouent un rôle important dans l'activité photosynthétique ainsi que dans la structure et la fonction des membranes cellulaires, siège de divers échanges métaboliques dans la cellule. L'appréciation de l'importance du stress oxydant chez ces deux espèces végétales causé par l'As peut ainsi être évaluée par le dosage du malonyldialdéhyde (MDA), un des produits terminaux formés lors de la peroxidation des lipides membranaires. A la notion initiale de dosage du malonyldialdéhyde, s'est progressivement substituée la notion de substances réactives à l'acide thiobarbiturique

(TBARS) (Khan, 2007). La Figure III.50 présente les teneurs en TBARS mesurées au niveau des feuilles de *V. faba* et *S. nigrum* en fonction du degré d'oxydation et de la concentration en As inorganique.

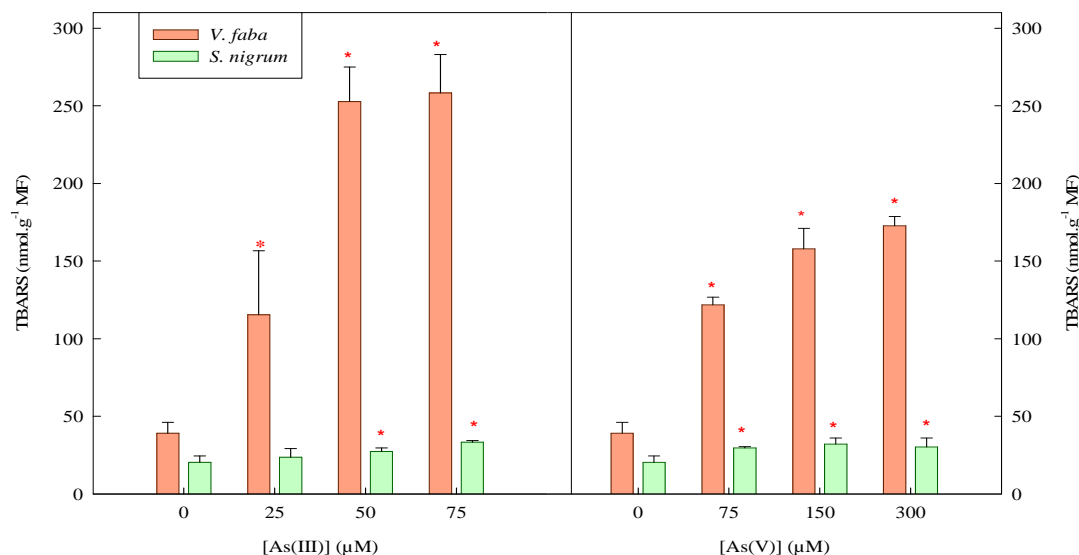


Figure III.50 : Mesure des teneurs en TBARS dans les feuilles de *V. faba* et *S. nigrum* cultivées en solution hydroponique enrichie en As(III) ou en As(V) (n = 5, (*) différences significatives par rapport aux conditions contrôles, ANOVA, p < 0,05).

Les résultats montrent une forte production de TBARS dans les feuilles de *V. faba* cultivées en présence d'As(III) et d'As(V). La concentration en TBARS est 3 à 4 fois plus importante que celle mesurée en condition témoin, ce qui implique un stress oxydatif important. Dans les feuilles de *S. nigrum* la formation de TBARS augmente significativement à partir de 50 μM d'arsénite et 75 μM d'arséniate. Cependant cette augmentation est moins prononcée que pour *V. faba*, elle est de 44 % en présence de 75 μM d'As(V) et atteint 62 % en présence de 75 μM d'As(III). Ces observations confirment une toxicité plus importante de l'arsénite par rapport à l'arséniate chez les deux espèces végétales. Par ailleurs, la formation de TBARS dans la plante est directement reliée à la teneur en As inorganique dans la solution nutritive particulièrement chez *V. faba*. Celle-ci est mise en évidence par l'existence, chez *V. faba*, d'une corrélation positive entre la production de TBARS et la concentration en As dans la solution nutritive ($R^2 = 0,80$ pour l'AsIII et $R^2 = 0,76$ pour l'AsV). Ces substances, formées lors de la peroxydation des lipides membranaires, peuvent donc être utilisées comme bioindicateur de l'état de stress de la plante. En effet, comme observé lors de l'étude de

l'activité physiologique de *V. faba*, l'As inorganique entraîne d'importantes perturbations du métabolisme de la plante, mis en évidence par une forte production de TBARS.

4. Discussion

Dans les sols industriels fortement contaminés par l'As, la fraction échangeable et acido-soluble de l'As, facilement mobilisable, représente une part faible des teneurs totales observées dans ces milieux anthropisés. De fait, les concentrations d'As inorganique dans la solution nutritive surexposent les plantes à ce métalloïde. En effet, l'offre de l'As lors de culture hydroponique reflète, dans une certaine mesure, la phytodisponibilité de l'As présent dans la solution du sol ou faiblement adsorbé aux constituants du sol (Moreno-Gimenez *et al.*, 2010). L'étude de la phytotoxicité de l'As dans ces conditions, en terme de production de biomasse, de fonctionnement des appareils photosynthétiques, de stress oxydatif ou de teneurs en As dans la plante, peut ainsi être extrapolée pour évaluer le comportement des plantes sur sol pollué et leur implication dans un processus de phytoremédiation.

4.1. Absorption et stockage de l'arsenic dans les plantes

L'absorption d'As inorganique par *V. faba* et *S. nigrum* a augmenté en réponse aux quantités apportées d'As(III) ou d'As(V) dans la solution. Chez *V. faba*, une corrélation positive ($R^2 = 0,99$) entre les concentrations en As dans la solution et les teneurs mesurées dans les racines a été observée pour l'As(III) et pour l'As(V) à l'exception des teneurs élevées en As(V) (300 μ M). Pour cette dernière condition, la capacité d'absorption de *V. faba* a fortement diminué. Ceci peut être corrélé à une réduction drastique de la biomasse racinaire associée à une sénescence des tissus racinaires. Une accumulation de l'As proportionnelle à la quantité d'As inorganiques en solution chez des espèces non accumulatrices d'As a été observée dans plusieurs travaux (Carbonell *et al.*, 1998 ; Arnetoli *et al.*, 2008 ; Moreno-Gimenez *et al.*, 2012). Ces différents résultats semblent indiquer qu'il n'existe pas de régulation dans l'absorption des formes inorganiques de l'As chez *V. faba*. Cette absence de contrôle peut être considérée comme un signe de sensibilité au polluant (Verbruggen *et al.*, 2009). Pour *S. nigrum*, l'absorption des formes inorganiques de l'As est réduite à partir d'une certaine concentration accumulée dans la plante. *S. nigrum* semble être capable de contrôler l'absorption d'As, qui se stabilise autour de 1 400 mg.kg⁻¹ MS pour l'As(V) et 650 mg.kg⁻¹ MS

pour l'As(III) en moyenne dans la plante. Abercrombie *et al.* (2008) ont mis en évidence un phénomène de régulation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs du phosphate et permettant de limiter l'absorption d'As(V). Par ailleurs, Wang et son équipe (2010) ont observé l'oxydation d'une fraction de l'As(III) (de 16 à 76 %) en As(V) dans un milieu de culture oxygéné. Ces deux phénomènes pourraient ainsi expliquer la régulation de l'absorption de l'arsénite et de l'arséniate par les transporteurs du phosphate chez *S. nigrum*. Par ailleurs, l'étude des facteurs de translocation a mis en évidence un stockage de l'As inorganique majoritairement dans les racines pour les deux espèces. En effet, les ions arsénates peuvent être réduits en arsénites dans les racines par l'action de l'arséniate réductase, l'As(III) complexé à des phytochélatines peut être transporté et sequestré dans les vacuoles racinaires *via* des transporteurs ABC localisés sur les tonoplastes des vacuoles racinaires (Song *et al.*, 2010 ; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2010). Les racines jouent ainsi le rôle d'organe piège limitant la toxicité de l'As et améliorant la tolérance des plantes (Geng *et al.*, 2006 ; Mateos-Naranjo *et al.*, 2008 ; Bech *et al.*, 2012).

4.2. Toxicité de l'As et impact sur l'activité photosynthétique

L'accumulation de l'As peut être responsable de dommages importants dans le fonctionnement et le développement de la plante. Des études sur la toxicité de l'As ont montré que les espèces végétales non résistantes à l'As subissent un stress important lors d'une exposition à l'As inorganique responsable de symptômes tels que la réduction du taux de photosynthèse (Stoeva *et al.*, 2003 et 2005) ou l'inhibition de la croissance du système racinaire pouvant entraîner une réduction significative de la croissance et du développement des plantes et même leur mort (Panda *et al.*, 2010). Ces observations sont des processus observés chez *V. faba*. En effet, une réduction de la photosynthèse nette est observée en présence d'arsénite et d'arséniate à faibles concentrations (à partir de 25 μ M d'As(III) et de 75 μ M d'As(V)) chez *V. faba* et pour des teneurs très élevées (75 μ M d'As(III) et 300 μ M d'As(V)) chez *S. nigrum*. Celle-ci est accompagnée chez *V. faba* d'une réduction de la conductance stomatique et de la transpiration sans variation significative de la concentration intercellulaire en CO₂. Ces observations impliquent que la limitation de la voie stomatique n'est pas responsable de la réduction de l'activité photosynthétique. D'autres voies d'action de l'As peuvent être avancées, la perturbation du fonctionnement des photosystèmes, une altération de la biosynthèse des pigments chlorophylliens et/ou une inhibition de l'activité de la Rubisco.

4.2.1. Effet de l'arsenic sur le fonctionnement des photosystèmes

Dans un premier temps, cette étude a mis en évidence un impact de l'As sur les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes suite à l'inhibition de leurs biosynthèses (Li *et al.*, 2007 ; Rahman *et al.*, 2007). La diminution des teneurs en chlorophylles est principalement associée à une action inhibitrice de l'As sur l'activité de l'enzyme 5-aminolévulinate déshydratase (ALAD) régulant la disponibilité de l'acide δ aminolévulinique (ALA), le précurseur des tétrapyrroles (Jain et Gadre, 2004). D'autre part, Mateos-Naranjo *et al.* (2012) ont montré que chez *Spartina densiflora*, un stress arsénié entraîne une réduction des teneurs en Mg et en Fe, éléments indispensables dans la synthèse des chlorophylles. La diminution du rapport Chl *a/b* dans certaines conditions de stress arsénié ($[AsV] > 150 \mu M$ et $[AsIII] > 75 \mu M$) chez *V. faba* pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'oxydation des groupes méthylés de la chlorophylle *a*, processus observés chez des lichens en présence d'un excès de Cu (Chettri *et al.*, 1998). De plus, ces perturbations pourraient être une indication des altérations de la membrane des thylakoïdes entraînant une inhibition des capacités photosynthétiques (Päivöke et Simola, 2001).

De ce fait, les antennes collectrices des PSII (LHC), moins concentrées en pigments chlorophylliens, limitent la capacité d'absorption de l'énergie lumineuse (Petit *et al.*, 2008). L'action de l'As sur les teneurs en pigments chlorophylliens se matérialise donc sur l'efficacité photochimique des PSII (Φ_{PSII}). Néanmoins, la réduction de Φ_{PSII} peut être consécutive à la diminution de la saturation photochimique (qP), reflétant la proportion des centres réactionnels du PSII ouverts, accompagnée d'une augmentation du quenching non photochimique (NPQ). Ceci impliquerait une dissipation de la lumière en excès sous forme de chaleur permettant la protection de la plante contre les dommages induits par un excès de lumière (Maxwell et Johnson, 2000). Parallèlement, l'As inorganique a un effet néfaste sur l'efficacité photochimique des PSII et sur leur capacité à réduire l'accepteur primaire Q_A . En effet, chez *V. faba* et dans une moindre mesure chez *S. nigrum*, la variable F_v/F_m réagit négativement lors d'une exposition à l'As inorganique. Elle reflète une altération de la structure et du fonctionnement des PSII, résultats confirmés par les travaux de Stoeva et Bineva (2003) sur l'avoine. La diminution de F_v/F_m résulte d'une augmentation de F_0 , et d'une diminution de F_m . Ainsi, au-delà de l'état de réduction des quinones A, l'As semble inhiber l'activité du centre réactionnel P_{680} qui contient une paire de molécules de chlorophylles *a* spécifiques vers lesquelles convergent l'énergie d'un photon captée par les antennes collectrices (LHC). De même la sensibilité à l'As du complexe d'émission de l'oxygène, à l'origine de la libération d'électrons, est matérialisée par la diminution des paramètres de

fluorescence Φ_{PSII} et F_v/F_m . De fait, l'inhibition de l'efficacité des PSII, complexe multi protéique composé de 25 sous-unités, peut être causée par l'altération des sites donneurs d'électrons (P_{680}) ou des sites accepteurs (Q_A) (Cornic, 2007). Ces altérations ont été également observées pour des polluants métalliques tels que le Pb et le Cd sur de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) par Kalaji et Loboda (2007). L'As influe donc négativement sur l'organisation structurale des photosystèmes et est responsable d'une réduction de l'énergie lumineuse absorbée ainsi que de l'altération de l'efficacité photochimique des PSII. Ces phénomènes sont largement observés chez *V. faba* qui présente une perturbation importante du fonctionnement des PSII matérialisée par une réduction des pigments foliaires et des paramètres de fluorescence en présence d'arsénite et d'arséniate même faiblement concentrés. L'inhibition du fonctionnement des PSII et l'altération de leur structure n'ont été observées que dans des conditions extrêmes de stress arsénié ($As(III) = 75 \mu M$ ou $As(V) = 300 \mu M$) chez *S. nigrum*.

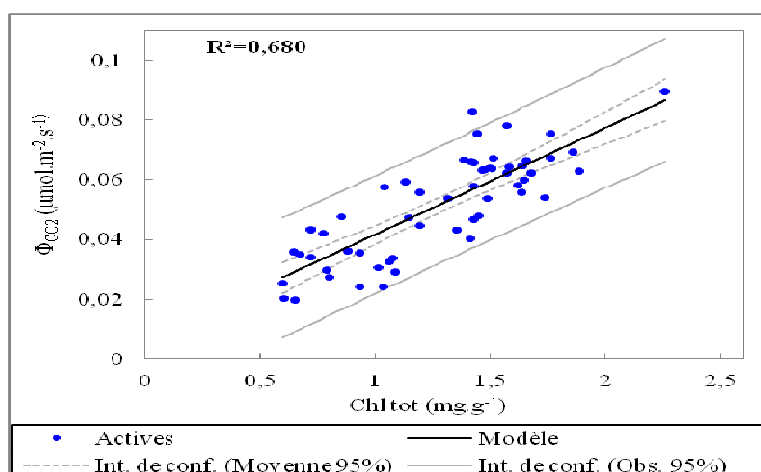


Figure III.51 : Représentation du rendement quantique de la fixation du CO_2 (Φ_{CO_2} , $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) en fonction des teneurs en chlorophylles totales dans les feuilles.

Les courbes de saturation lumineuse confirment l'altération des fonctions du PSII dans la captation de l'énergie lumineuse et la conversion de celle-ci en énergie chimique nécessaire pour l'assimilation du CO_2 . En effet, une diminution significative du rendement quantique de la fixation du CO_2 (Φ_{CO_2}) est observée en présence d'As inorganique. Cette diminution est significative chez *V. Faba* pour de faibles teneurs en As inorganique. Elle est significative pour *S. nigrum* dans des conditions extrêmes de stress en As(III) ($[As(III)] = 75 \mu M$) et en As(V) ($[As(V)] = 300 \mu M$), conditions responsables d'une altération des teneurs en

chlorophylles. De fait, d'après la Figure III.51, une corrélation existe entre les teneurs en chlorophylles totales et le rendement quantique de la fixation du CO₂ ($R^2 = 0,68$).

D'autre part, la présence de l'As inorganique perturbe la respiration à l'obscurité des plantes, notamment chez *V. faba*. Par conséquent, l'énergie lumineuse nécessaire pour que la photosynthèse compense la respiration ($P_n = 0$) est d'autant plus importante, l'intensité de compensation suit donc la même évolution que R_0 . De même, l'énergie lumineuse nécessaire pour atteindre le taux maximal d'assimilation nette du CO₂ augmente en condition de stress, l'impact de l'As inorganique étant là encore moins marqué chez *S. nigrum*.

4.2.2. Effet de l'arsenic sur l'activité de la Rubisco

Au-delà du fonctionnement des photosystèmes, l'activité photosynthétique est régulée par la fixation du CO₂ par la plante et son assimilation *via* le cycle de Calvin. Celle-ci semble inhiber par la présence de l'As inorganique. En effet, les courbes de saturation en CO₂ montrent une action de l'As sur l'activité Rubisco, avec l'inhibition, d'une part, des fonctions oxygénases entraînant une diminution de la photorespiration (R_1) et, d'autre part, des fonctions carboxylases synonyme de réduction dans l'assimilation du CO₂ *via* le cycle de Calvin. Cette altération du fonctionnement de la Rubisco en présence d'As inorganique, observée dans de nombreuses études sur le stress As chez les plantes (Duquesnoy *et al.*, 2009 ; Ahsan *et al.*, 2010 ; Mateos-Naranjo *et al.*, 2012), peut avoir plusieurs explications. Elle peut être causée par une limitation de l'activité de la Rubisco suite à la fixation de l'As sur les sites actifs de l'enzymes (Akter *et al.*, 2004). Cette altération peut aussi être provoquée par une faible régénération du Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) ou une diminution du taux d'utilisation des phosphates trioses (TPU) (Sharkey *et al.*, 2007). Duquesnoy *et al.* (2009) soulèvent la possibilité que le dysfonctionnement de la Rubisco pourrait être causé par une augmentation du catabolisme du pool protéique de la Rubisco. Enfin, Ahsan *et al.* (2010) émet l'hypothèse d'une régulation à la baisse de l'activité Rubisco et des ribonucléoprotéines chloroplastiques en réponse au stress As. L'altération du fonctionnement de la Rubisco a une répercussion directe sur le taux maximal d'assimilation du CO₂ ($P_n \text{ max}_{CI}$), qui est réduit significativement en présence d'As inorganique chez les deux espèces végétales. Chez *S. nigrum*, l'activité de la Rubisco a été inhibée en présence d'arséniate même faiblement concentré et en présence de teneurs élevées en arsénite ($[As(III)] = 75 \mu M$). Chez *V. faba*, l'apport d'As inorganique dans la solution hydroponique, quelle que soit sa forme et sa concentration (excepté en présence de

25 μM d'As(III)), entraîne une réduction de plus de 50 % de l'activité de la Rubisco, ayant pour conséquence immédiate une réduction drastique de l'assimilation nette de CO_2 .

4.2.3. Phénomène de photoprotection et de photoinhibition

Un phénomène de photoinhibition est observé chez les deux espèces végétales en condition de stress arsénié. Cette réaction est observée lors de forts éclaircissements et en présence d'As(III) et des teneurs élevées en As(V) (300 μM) chez *S. nigrum* et en présence d'As(V) et des teneurs élevées en As(III) (75 μM) chez *V. faba*. Ce phénomène est provoqué par une forte lumière induisant la production d'Espèce Réactive à l'Oxygène (ERO) qui inactivent les centres réactionnels des PSII et pourraient ainsi expliquer la diminution de l'efficacité photochimique des PSII (F_v/F_m) (Cornic, 2007). En effet, si l'énergie d'excitation de la chlorophylle est supérieure à celle qui peut être convertie en flux électronique, ou si le flux électronique destiné à la photochimie est supérieur aux capacités de carboxylation ou d'oxygénation de la Rubisco, des ERO peuvent se former et conduire à un stress photooxydatif (Adams *et al.*, 2005). L'altération de l'activité du PSII sous une forte lumière peut donc être un déséquilibre entre les photodommages, caractérisés principalement par la dégradation des protéines des PSII, et l'inhibition des protéines et enzymes nécessaires à la réparation du système et notamment les protéines D1 et D2 (Kim et Lee, 2005). Selon une étude de Murata et son équipe (2007), il semble que les contraintes environnementales, à l'exception d'un excès de lumière, agissent principalement en inhibant la réparation des PSII, cette observation est confortée par les travaux de Pagliano *et al.* (2006) sur le Cd. De fait, le phénomène de photoinhibition observé chez les deux espèces végétales lors d'un stress arsénié semble être, dans certaines conditions, la conséquence de l'altération des fonctions et de la structure des PSII. Parallèlement, afin de limiter les transferts d'énergie et la formation des ERO, des mécanismes adaptatifs permettent la régulation de la synthèse de molécules clés (en particulier les chlorophylles) ou de l'activité d'enzymes impliquées dans la photosynthèse (Dazy, 2008). Ces mécanismes de photoprotection visent à équilibrer l'activité des différents processus de la photosynthèse entre eux et en fonction de la demande en assimilats (Adams *et al.*, 2005). En l'absence de perturbations significatives de l'activité photosynthétique, tant au niveau des photosystèmes qu'au niveau de l'activité de la Rubisco, ce phénomène de photoinhibition pourrait être considéré comme un mécanisme de photoprotection chez *S. nigrum*. Il vise à réduire la phytotoxicité de l'As et par conséquent la production d'ERO, et ainsi limiter le stress oxydatif chez *S. nigrum* en présence d'As. Par ailleurs, la réduction du rapport Chl tot/Car, observée principalement chez *S. nigrum* à partir de 50 μM d'arsénite et

150 μM d'arséniate en solution, met en évidence une augmentation de la proportion des caroténoïdes par rapport aux chlorophylles en condition de stress arsénié. Les caroténoïdes, capables d'éliminer les états triplets de la chlorophylle ainsi que l'oxygène singulet (Cornic, 2007), pourraient ainsi favoriser les mécanismes de protection des photosystèmes mises en jeu par la plante. Ce phénomène est aussi mesuré chez *V. faba* en présence de 300 μM d'As(V).

4.3. Impact de l'As sur les lipides membranaires

Le traitement par l'As inorganique provoque des modifications importantes au niveau du métabolisme des lipides et des acides gras chez *V. faba* et dans une moindre mesure chez *S. nigrum*. En effet, l'analyse de la composition en lipide des feuilles a mis en évidence la réduction significative du biomarqueur d'exposition (le rapport $\text{C18:3}/(\text{C18:0}+\text{C18:1}+\text{C18:2})$) chez *V. faba* en présence d'arséniate et des teneurs élevées en arsénite (75 μM), caractérisant l'effet toxique de ces formes arséniées sur cette espèce. Ce biomarqueur d'exposition n'a été que faiblement impacté chez *S. nigrum*, et permet de mettre en évidence une toxicité limitée de l'As inorganique sur cette espèce. De plus, ce rapport a permis de montrer que les feuilles des deux espèces végétales sont principalement composées d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Ceux-ci sont les principaux constituants de la membrane des thylakoïdes et les plus sujets aux attaques radicalaires (Ramel, 2009). De fait, la composition et l'organisation des lipides au niveau de la membrane (degré d'insaturation des acides gras, mobilité des lipides dans la bicouche lipidique, ...) influencent l'ampleur de la peroxydation lipidique (Blokhina *et al.*, 2003). Celle-ci a été mise en évidence par la formation de TBARS dans les feuilles des deux espèces végétales lors d'un stress arsénié, en particulier chez *V. faba*. L'As a généré un stress oxydatif en catalysant la formation d'ERO qui s'attaquent aux acides gras polyinsaturés et provoquent leur peroxydation. Ainsi, la peroxydation des lipides chloroplastiques peut être responsable de perturbations dans l'ultrastructure des thylakoïdes entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées, et en particulier les PSI et PSII. Elle peut, par ailleurs, entraîner la libération de composés carbonés tels que des pentanes et des aldéhydes qui à fortes concentrations sont toxiques pour la cellule (Hervé, 2006).

4.4. Tolérance et impact de l'arsenic sur l'activité photosynthétique et le développement des plantes

Tableau III.22 : Impact de la forme et de la concentration de l'As inorganique sur les paramètres photosynthétiques et biochimiques de *S. nigrum* et *V. faba* cultivées en solution hydroponique, résultats du test ANOVA avec les différences significatives (*, **, ***, F-test significatif à $P \leq 0,05$, 0,01 et 0,001, respectivement) et non significatives (NS) par rapport aux conditions contrôles, BM lip = Biomarqueur lipidique.

$\mu\text{mol.L}^{-1}$	<i>S. nigrum</i>						<i>V. faba</i>					
	AsIII			AsV			AsIII			AsV		
	25	50	75	75	150	300	25	50	75	75	150	300
Pn	NS	NS	***	NS	NS	**	***	***	***	***	***	***
Chl tot	NS	NS	***	NS	NS	NS	***	**	***	**	***	***
Car	NS	NS	***	NS	NS	NS	***	***	***	***	NS	*
Φ_{PSII}	NS	NS	*	NS	NS	NS	***	***	***	NS	**	***
F_v/F_m	NS	***	***	NS	*	NS	**	***	***	*	***	**
R_l	NS	NS	NS	NS	NS	*	***	***	**	**	***	***
Γ^*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
Vc max	NS	NS	**	*	**	***	***	**	***	**	***	***
R_d	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS	**	**	*	**	NS
Γ	NS	NS	NS	NS	*	***	***	***	***	**	***	***
Φ_{CO_2}	NS	NS	**	NS	NS	*	***	***	***	**	***	***
I_s	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TBARS	NS	*	*	NS	NS	NS	**	***	***	***	***	***
BM lip	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**

Le Tableau III.22 met en évidence les variations significatives des différents paramètres photosynthétiques et biochimiques étudiés chez *S. nigrum* et *V. faba* cultivées en solution hydroponique en fonction des teneurs et de la forme de l'As inorganique par rapport

aux conditions contrôles. Ces résultats donnent des indications sur l'action des deux formes inorganiques de l'As, arséniate et arsénite, chez les deux espèces végétales.

Pour *S. nigrum*, l'arséniate n'entraîne pas de modification significative des teneurs en pigments et ne semble que très peu altérer le fonctionnement des photosystèmes. De fait, la réduction du taux de photosynthèse nette (P_n) semble résulter d'une inhibition de l'activité carboxylase et oxygénase de la Rubisco. Elle est illustrée par la réduction significative de la vitesse de carboxylation maximale de cette enzyme ($V_c \text{ max}$) ainsi que par la réduction de la photorespiration (R_i). Celle-ci est accompagnée d'une altération du rendement quantique de la fixation du CO_2 (Φ_{CO_2}), du point de compensation en CO_2 (Γ) et de la respiration mitochondriale (R_d). L'action de l'arséniate sur le fonctionnement de la Rubisco pourrait être la conséquence de l'analogie de l'As(V) avec le phosphate. L'As(V) peut ainsi se substituer au phosphate de l'ATP pour former le complexe ADP-As (Panda *et al.*, 2010) et de fait conduire à la perturbation du flux d'énergie nécessaire pour la régénération du RuBP et le fonctionnement de la Rubisco. Au contraire, l'action de l'arsénite chez cette espèce semble se concentrer sur la biosynthèse des pigments chlorophylliens, dont les teneurs sont fortement réduites en présence de 75 μM d'As(III), et sur la structure et le fonctionnement des PSII. L'augmentation significative des produits de la peroxydation des lipides membranaires (TBARS), dont les lipides chloroplastiques, accentue le dysfonctionnement des photosystèmes. Ces altérations en présence d'arsénite ont pour conséquence une réduction de la capacité d'absorption de l'énergie lumineuse ayant des répercussions directes sur le rendement quantique de la fixation du CO_2 (Φ_{CO_2}) et *in fine* sur l'activité carboxylase de la Rubisco ($V_c \text{ max}$). Le phénomène de photoinhibition, observé pour les faibles teneurs en arsénite (inférieures à 50 μM) et pour les teneurs élevées en arséniate (300 μM) chez cette espèce, peut ainsi être considéré comme un mécanisme de photoprotection. A l'inverse, la photoinhibition, mesurée pour des teneurs de 75 μM d'As(III), illustre l'altération des photosystèmes.

Chez *V. faba*, l'As inorganique, quel que soit son degré d'oxydation, altère l'activité oxygénase et carboxylase de la Rubisco ainsi que la structure et le fonctionnement des photosystèmes et la biosynthèse des pigments photosynthétiques. Ces perturbations importantes enregistrées chez cette espèce en présence d'As illustrent sa forte sensibilité à cet élément.

L'ensemble de ces troubles physiologiques, en particulier l'altération de la conductance stomatique et de la transpiration perturbant les flux hydriques au sein de la plante, ont entraîné une forte inhibition du développement de la biomasse aérienne et racinaire. De plus, chez *V.*

faba, l'apparition de chloroses et de nécroses au niveau des feuilles synonymes de la sénescence de certains tissus, pourraient être attribuée à une déficience en éléments minéraux notamment le manganèse, le magnésium et le fer.

Les indices de tolérance, dont le calcul est présenté ci-dessous (Samantaray *et al.*, 1998), permet d'évaluer la capacité des plantes à tolérer et donc à se développer en condition de stress arsénié :

$$TI (\%) = \frac{\text{Longueur moyenne de la tige dans une solution enrichie en As}}{\text{Longueur moyenne de la tige dans une solution sans As}} * 100$$

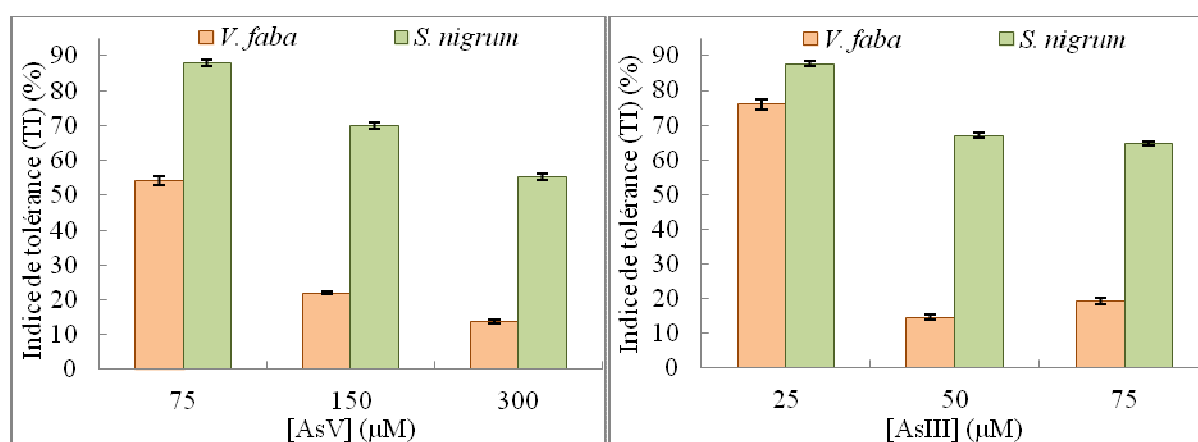


Figure III.52 : Indices de tolérance de *S. nigrum* et *V. faba* calculés à partir de la longueur de la tige et en fonction de la forme et de la teneur de l'As dans la solution hydroponique après 14 jours de culture (n = 5).

Ces résultats confirment une grande sensibilité de *V. faba* à l'As inorganique, les indices de tolérance calculés atteignent à peine 20 % lorsque les teneurs en As dans la solution sont de 50 et 150 µM respectivement pour l'As(III) et l'As(V) (Figure III.52). Au contraire, les indices de tolérance mesurés chez *S. nigrum* sont toujours supérieurs à 50 % quelque soit la forme et la quantité d'As apporté et confirme ainsi la capacité de cette espèce à tolérer et donc à limiter la phytotoxicité de l'As. Par ailleurs, ces résultats soulignent l'inhibition de la croissance des plantes en présence d'As inorganique. De plus, la variation de l'indice de tolérance confirme une plus grande toxicité de l'arsénite que de l'arséniate, pour une même quantité d'As(III) ou d'As(V) apportée (75 µM), l'indice de tolérance est plus élevé en présence d'arséniate que d'arsénite (respectivement 87,9 et 64,7 % pour *S. nigrum* et 54,2 et 19,4 % pour *V. faba*).

Cependant la différence dans l'absorption de l'As chez ces deux espèces végétales est quantitativement insuffisante pour expliquer la différence de tolérance observée. En effet, l'accumulation de l'As inorganique est semblable entre les deux espèces et est relativement dépendante des teneurs en As présentes dans la solution de culture. Cette caractéristique semble indiquer la présence intracellulaire de ligands organiques (phytochélatines, glutathion, métallothionéines) chez *S. nigrum* assurant une complexation de l'As inorganique qui permet ainsi de réduire sa toxicité et, de fait, favorise son stockage dans les systèmes vacuolaires (Sun *et al.*, 2007 ; Verbruggen *et al.*, 2009 ; Briart, 2010). De plus, l'étude du métabolisme anti-oxydant et notamment de l'activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) et de la gultathion reductase (GR) montre une réponse de ces enzymes dépendante des formes et des teneurs en As inorganique (résultats non présentés ici et qui feront l'objet d'une publication). En effet, l'activité de ces enzymes augmente avec le stress arsénié chez *S. nigrum*, les réponses de la SOD et de la CAT étant les plus marquées. L'activité de ces enzymes chez *V. faba* augmente elle aussi avec les teneurs en As dans la solution, cependant cette augmentation est plus mesurée que chez *S. nigrum*. Ainsi, *S. nigrum* a été capable de contrer la production d'ERO suite au stress oxydatif occasionné par l'As grâce au métabolisme anti-oxydant et donc de limiter les dégâts pouvant être causé par l'As.

Quatrième partie :
Discussion générale

Ces dernières années, les questions de santé environnementale ont pris une place importante dans le débat public de notre société. De fait, l'existence de nombreux sites industriels ou miniers fortement contaminés par les éléments traces métalliques a incité à placer la pollution des sols au centre des préoccupations environnementales. Deux aspects sont à prendre en compte pour justifier de la nécessité de rendre prioritaire la revalorisation des sites pollués. D'une part, l'évolution du secteur industriel et l'abandon progressif de l'activité minière en France ont conduit à l'arrêt de nombreuses usines et industries et à l'augmentation de zones polluées délaissées, les friches industrielles. D'autre part, la pression démographique et, de fait, foncière autour des grandes villes incite à trouver des solutions de remédiation applicables à grande échelle et économiquement viables. Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse est d'évaluer la pertinence de l'utilisation d'un procédé de phytostabilisation pour la dépollution d'une friche industrielle située sur la commune d'Auzon en Haute Loire (France) et présentant une pollution polymétallique. De fait, une partie de ce travail est consacrée à déterminer les effets de cette pollution sur une sélection d'espèces végétales. Le travail effectué a permis d'évaluer l'impact de la pollution au niveau physiologique et biochimique et donc de déterminer la capacité de tolérance de différentes espèces végétales. L'arsenic, polluant majoritaire sur le site de la Vieille Usine d'Auzon, a concentré une partie de notre attention.

Chapitre I : Les impacts de la contamination des sols par les éléments traces métalliques sur les communautés végétales et risque de transfert dans la chaîne trophique

Notre étude a été réalisée sur le site de la Vieille Usine d'Auzon (43). L'étude pédochimique menée au début de ce travail a permis de mettre en évidence une forte pollution métallique d'origine anthropique et dominée principalement par l'arsenic. Or, le compartiment sol est en interaction avec de nombreux composants du milieu, sa dégradation a des conséquences néfastes sur l'évolution du milieu et sur la composition des populations de la microflore, de la pédofaune et de la macrofaune, ainsi que sur le développement de la végétation.

Ce site anthropique pollué a ainsi vu se développer une végétation particulière dont les associations végétales sont inféodées à ce type de milieu. Cette végétation présentant une faible diversité est caractérisée par la dominance d'*Agrostis capillaris*, espèce reconnue comme tolérante à l'As, et la présence d'autres pseudométallophytes électives, les

euphorbiacées, *E. amygdaloïdes* et *E. cyparissias*, mais aussi *Equisetum arvense*. Les herbacées et particulièrement les Poacées sont largement dominantes sur le site pollué. En effet, elles regroupent de nombreuses espèces pionnières capables de tolérer et de s'implanter dans un milieu très perturbé (Bès, 2008). Par ailleurs, la faible proportion de certaines familles d'ordinaire bien représentées dans les écosystèmes prairiaux, en particulier les astéracées et les fabacées, met en avant la sensibilité de ces taxons aux polluants métalliques.

Le dosage des ETM dans la végétation inféodée au site a mis en évidence le degré de transfert des polluants vers la végétation et donc *in fine* leur bioaccessibilité pour l'homme. L'accumulation des ETM dans la végétation est dépendante d'une part de la nature du polluant, de sa forme chimique et de sa disponibilité et d'autre part des espèces végétales en présence. En effet, chaque espèce présente une stratégie de tolérance et d'adaptation propre à chaque polluant. De façon générale, la majorité des espèces présentes sur la friche industrielle a accumulé de très faibles quantités de polluants (As, Pb) dans ces parties aériennes. Elles ont privilégié la stratégie de l'exclusion au niveau du système racinaire pour limiter l'accumulation des polluants dans leurs organes. Cependant, quelques espèces dites accumulatrices, sont capables d'accumuler les polluants métalliques et de les stocker dans leur partie aérienne, c'est le cas de *E. arvense* pour l'As et dans une moindre mesure de *A. capillaris* et *E. amygdaloïdes* vis-à-vis de l'As et du Pb qui sont, dans ce cas, accumulés préférentiellement dans les racines. Il est intéressant de noter que ces espèces, capables d'accumuler les polluants métalliques, sont toutes considérées comme des pseudométallophytes électives.

De fait, la diversité végétale sur ses zones fortement contaminées confirme la capacité de certaines espèces à s'adapter à la pollution du sol par les ETM permettant de coloniser ce type de zone. Certaines de ces espèces présentent une large tolérance écologique vis-à-vis de la pollution, pour d'autres le phénomène d'adaptation est le reflet de phénomènes microévolutifs intervenus au sein de populations soumises à une forte pression de sélection. Ainsi, l'étude d'une végétation métallicole permet de relever les espèces végétales tolérantes à la pollution et qui suscitent un intérêt particulier pour les techniques de phytoremédiation. De plus, l'originalité du couvert végétal d'un site pollué incite à considérer celui-ci comme un bon indicateur de l'état du milieu. Il pourrait de ce fait être utilisé pour évaluer le degré de perturbation de ces sites anthropisés et donc le risque éventuel qu'ils représentent pour la santé humaine.

Chapitre II : Effets physiologiques et biochimiques de l'arsenic et dans un cadre plus général des éléments traces métalliques sur les plantes

L'étude de l'impact de la pollution sur une sélection d'espèces végétales a permis de cibler l'action des polluants métalliques sur les structures cellulaires et le métabolisme des plantes. Ce travail a été réalisé sur 4 espèces végétales présentant chacune un intérêt particulier, il s'agit de *Vicia faba*, *Solanum nigrum*, *Agrostis capillaris* et *Cannabis sativa*.

Dans un premier temps, notre attention s'est portée sur l'étude des mécanismes de la photosynthèse qui ont permis d'identifier les impacts des ETM sur le développement des plantes. Les polluants métalliques présentant des teneurs élevées dans le sol (As, Sb, Pb, Cu et Cd) ont causé des dommages physiologiques plus ou moins marqués chez les quatre espèces végétales. En effet, un ralentissement de l'activité photosynthétique a été observé chez toutes les espèces, entraînant de fait une réduction de la croissance des plantes sur sol pollué pouvant aller jusqu'à la sénescence de certains tissus observée chez *V. faba*. Celle-ci est en effet l'espèce sélectionnée la plus sensible aux polluants métalliques. *A. capillaris*, reconnues comme espèce tolérante et/ou hyperaccumulatrice d'ETM (Ernst, 2006 ; Wang et Mulligan, 2006) et très présente sur le site industriel d'Auzon, a montré un ralentissement de ses activités physiologiques sur sol pollué, entraînant une réduction de son développement. Or, les graines d'*A. capillaris* testées ne sont pas issues du site pollué et sont donc des écotypes non métallicoles. Ces différences de comportement mettent donc en évidence une tolérance adaptative de l'espèce permettant une adaptation locale à la contamination du sol des écotypes métallicoles (Bes, 2008). De fait, cette caractéristique limite l'utilisation d'écotypes non métallicoles dans des programmes de phytostabilisation. L'espèce *S. nigrum* a montré, par des tests en pot puis en hydroponie, une capacité à se développer et à maintenir une activité photosynthétique proche de celle mesurée en conditions témoins. Ainsi, malgré l'utilisation d'écotypes non métallicoles, l'espèce tolère une pollution polymétallique (As, Sb, Pb, Cd et Cu). Au contraire d'*A. capillaris*, *S. nigrum* est une espèce présentant une tolérance polymétallique constitutive. L'accumulation des polluants et plus particulièrement de l'As est relativement faible au regard des quantités mesurées dans le sol, pour l'ensemble des plantes étudiées, le facteur de bioaccumulation est inférieur à 1. Cependant, les quantités absorbées par les plantes peuvent augmenter la phytotoxicité de ces polluants métalliques (particulièrement chez *V. faba*), ceux-ci pouvant interférer avec le métabolisme des plantes. *C. sativa*, capable d'exclure l'As au niveau de ses racines pour limiter son absorption ne

présente que de faibles perturbations photosynthétiques, le phénomène d'exclusion permet ainsi de limiter la toxicité de ces polluants sur *C. sativa*. Cependant sa faible production de biomasse lors de sa culture sur le sol pollué semble indiquer la nécessité d'enrichir le sol d'éléments minéraux, notamment en potassium et en azote. Un phénomène d'hypoxie observable au niveau du système racinaire suite à la filtration du sol à 2 mm pour la culture en pot pourrait aussi être un frein au développement des plantes et expliquer en partie les différences de développement observées entre les cultures en pot et *in-situ*.

L'As, polluant majoritaire sur le site de la Vieille Usine d'Auzon, a été l'objet d'une étude détaillée en hydroponie sur *V. faba*, espèce sensible aux ETM, et *S. nigrum*, dont la tolérance à l'As a été mise en évidence au cours de l'expérimentation en pots en conditions contrôlées. Cette étude a été réalisée dans le but de cibler l'action de l'As inorganique au niveau du métabolisme des plantes et plus particulièrement au niveau du fonctionnement de l'appareil photosynthétique. D'après les résultats obtenus sur ces deux espèces, l'As semble avoir deux effets privilégiés, d'une part il altère la structure et le fonctionnement des PSII et d'autre part il inhibe l'activité oxygénase et carboxylase de la Rubisco. En effet, à des degrés différents, l'As altère la biosynthèse des chlorophylles, molécules ayant un rôle essentiel dans la captation de l'énergie lumineuse et dans le fonctionnement des PSII. Une diminution du rendement quantique foliaire est donc observée lors d'un stress arsenic. De plus, l'altération de la structure des PSII a entraîné une diminution de leur efficacité photochimique et de leur aptitude à réduire les quinones et est, par conséquent, responsable de perturbations du transfert des électrons dans la chaîne photosynthétique. Chez *S. nigrum*, ces perturbations ont été observées en présence d'As(III) seulement, ce qui semble indiquer que cette forme arsénée agit préférentiellement sur les PSII. Par ailleurs, l'As inhibe le fonctionnement de la Rubisco, enzyme clé dans l'assimilation du CO₂ par la plante. En effet, une réduction plus ou moins prononcée de l'activité oxygénase et carboxylase de la Rubisco a été observée chez les deux espèces étudiées. Ce ralentissement du fonctionnement de la Rubisco pourrait être interprété comme une adaptation de l'enzyme à la réduction de la capacité des plantes à absorber les photons. Cependant, ce ralentissement est observé chez *S. nigrum* en présence d'As(V) dans des conditions où le fonctionnement des PSII et les teneurs en pigments ne sont pas impactés, ce qui semble confirmer un impact de l'As inorganique et en particulier de l'As(V) sur le fonctionnement de la Rubisco. L'analogie de l'arséniate avec le phosphore pourrait être responsable d'une réduction des flux énergétiques dans la cellule et ainsi être à l'origine de la perturbation du fonctionnement de la Rubisco chez les deux espèces. Aux plus fortes teneurs en As(III), l'augmentation de l'éclairement saturant (Is) chez *S. nigrum* indique que

l'absorption des photons et le principal facteur limitant de la photosynthèse. La mesure des échanges gazeux confirme le ralentissement de l'activité photosynthétique des plantes en présence d'As. Celle-ci est accompagnée d'une réduction de la conductance stomatique résultant de la fermeture des stomates. Ce phénomène couplé au changement dans la structure racinaire peut entraîner des modifications des flux hydriques au sein de la plante perturbant le transfert des nutriments dans la plante et donc son développement sur sols pollués. Par ailleurs, la diminution de la photosynthèse implique une réduction du métabolisme primaire et par conséquent impacte négativement sur la croissance des plantes.

Ainsi, le rendement photosynthétique de chacune de ces espèces a été perturbé à des degrés différents. En effet, l'As inorganique a montré une plus forte phytotoxicité vis-à-vis de *V. faba* que de *S. nigrum* en témoigne les faibles valeurs de l'indice de tolérance mesurées chez *V. faba* lors d'un stress arsénié. La tolérance de *S. nigrum* à l'As est probablement associée à l'existence de ligands organiques intracellulaires capables de complexer et de détoxifier l'As et de ce fait limite la formation des ERO principales causes des perturbations et des dégradations observées sur les structures cellulaires.

Chapitre III : Evaluation d'un procédé de phytostabilisation aidée sur une friche industrielle présentant une pollution polymétallique

Cette étude a été réalisée dans la friche industrielle située à Auzon (Haute-Loire, France). L'activité industrielle a commencé en 1902 par l'exploitation minière de l'arsénopyrite pour la fabrication de produits arsenicaux destinés principalement à l'agriculture. Par conséquent, le sol est considéré comme très contaminé et il est caractérisé par une importante pollution polymétallique avec l'As comme polluant majoritaire. Au regard des concentrations des différents polluants mesurées dans le sol, une stratégie de phytostabilisation a été privilégiée au détriment de la phytoextraction peu appropriée pour le traitement d'une pollution locale importante. De plus, l'extraction des polluants du sol par les plantes et leur stockage dans la biomasse aérienne augmente le risque de transfert des contaminants métalliques et métalloïdes non biodégradables dans la chaîne alimentaire. De fait, l'utilisation de la phytostabilisation aidée présente de nombreux avantages pour ce type de site. D'une part sa mise en place est plus aisée et plus économique (Pilon-Smith, 2005). D'autre part, la rétention des ETM dans la rhizosphère et dans les systèmes racinaires des plantes limite le risque de transfert des polluants vers la chaîne alimentaire. Elle semble donc

mieux adapter à la problématique des sites fortement contaminés par les ETM. En effet, l'immobilisation des polluants métalliques et métalloïdes par les amendements permet de limiter leur lessivage par les eaux de ruissellement et donc la contamination des milieux voisins. De plus, il réduit l'exposition des végétaux et permet ainsi une meilleure implantation de la végétation, plus dense et présentant une diversité plus riche. De fait, le développement d'un couvert végétal dense et diversifié limite les transferts de polluants par érosion éolienne, augmente la fertilité du sol et permet une intégration esthétique du site dans le paysage. Cependant, la phytostabilisation aidée n'aboutit pas à l'élimination des polluants du sol, elle facilite leur immobilisation, celle-ci étant étroitement dépendante des conditions physico-chimiques du sol. Le choix de l'amendement ainsi que celui du couvert végétal sont donc orientés pour que l'immobilisation des métaux soit durable.

La technique de phytostabilisation aidée nécessite deux étapes. Dans un premier temps, un amendement au sol est apporté pour immobiliser les polluants et faciliter l'implantation des végétaux. Dans un deuxième temps, une végétation permanente est installée. Elle doit être composée d'espèces végétales tolérantes qui permettent, par l'activité de leurs systèmes racinaires, d'augmenter l'immobilisation des polluants et, par la densité de leur biomasse, de limiter l'érosion du sol.

Parmi les amendements testés *in-situ*, la grenaille de fer zerovalent s'est révélée être la plus efficace. L'apport de grenaille de fer a entraîné une légère diminution de pH augmentant l'adsorption des anions métalliques sur les oxydes de fer. Or l'arséniate est la principale forme minérale de l'As présent dans le sol pollué d'Auzon (Cancès *et al.*, 2005). Sa forme anionique H_2AsO_4^- est l'espèce arsénée dominante à pH acide (pH de 2 à 7) (Joubert, 2008), l'adsorption de l'As sur les oxydes ferreux à pH acide est donc accentuée. Il en est de même pour l'antimoine inorganique dont les formes anioniques sont dominantes dans les sols (antimonite (Sb(III)O_2^-) et antimoniate (Sb(V)O_3^-)) (Beaugelin-Seiller et Garnier-Laplace, 2002). De plus, Leupin et Hug (2005) ont observé que la libération lente et continue de Fe(II) par la corrosion du Fe(0) fournit des conditions idéales pour l'oxydation de l'As(III) en As(V) considéré comme moins toxique et plus facilement adsorbé aux hydroxydes de fer formés. Cependant, la diminution de pH peut accentuer la mobilité des cations métalliques tels que le Pb (Pb^{2+} et Pb^{4+}), le Cd (Cd^{2+}) ou le Cu (Cu^{2+}) présents en excès dans le sol pollué. Pour le Pb et le Cd, des travaux menés par Brown *et al.* (2005) ont montré que la grenaille de fer n'avait peu ou pas d'influence sur la mobilité de ces éléments, des résultats conformes à ceux observés lors de cette expérimentation. Néanmoins, les faibles teneurs biodisponibles mesurées dans le sol pollué pour ces deux métaux limitent leur toxicité, celles-ci pourraient être la conséquence

d'un sol riche en phosphore, élément jouant un rôle essentiel dans la fixation du Pb et du Cd (Xenidis *et al.*, 2010). Les différents amendements testés n'ont pas permis de réduire significativement les teneurs biodisponibles en Cu dans le sol pollué. En effet, l'apport de grenaille de fer zérovalent ou de matière organique sous forme de compost n'a pas eu d'effet sur la réduction de la fraction biodisponible du Cu dans le sol pollué. Au contraire, l'accumulation du Cu par les végétaux, notamment au niveau des racines, a augmenté en présence de la matière organique. Une partie de la matière organique apportée a pu être dissoute et ainsi former, par la suite, des complexes avec le Cu (Cu-FA et Cu-HA) facilement assimilables par la plante. L'association de la grenaille de fer avec la matière organique a permis d'enrichir le sol en nutriments. De fait, l'apport de matière organique sous forme de lombri-compost, facilement assimilable par la végétation, en complément de la grenaille de fer pourrait accentuer le développement du couvert végétal. Une diminution de pH est également observée lors de l'apport combiné de ces deux amendements et peut avoir un impact négatif sur la lixiviation des cations métalliques. Cependant, l'acidification du milieu peut être neutralisée par l'application de quantités appropriées de chaux et ainsi limiter la lixiviation des métaux (Warren *et al.*, 2003). De fait, il est possible d'améliorer l'efficacité du traitement d'une pollution multi-métallique en appliquant une combinaison d'amendements pour obtenir les conditions les plus favorables pour la stabilisation des métaux et métalloïdes d'un sol très contaminé. De plus, l'utilisation du Fe(0), de part ses propriétés (très concentré en fer et oxydation lente), pourrait être bénéfique dans une perspective de revalorisation à long terme.

Au delà du choix de l'amendement, la réussite d'un procédé de phytostabilisation nécessite le développement d'un couvert végétal homogène. En effet, la nature de la végétation introduite influe sur la diversité floristique mais aussi sur l'exposition des végétaux. L'étude menée par Bes (2008) a montré que l'implantation d'espèces herbacées seules augmente la diversité végétale et limite l'exposition des plantes. L'étude du couvert végétal, composé d'une association de plantes herbacées, dans les différentes conditions de culture a montré des variabilités dans la diversité floristique et l'abondance de la végétation. Le premier constat est que l'ensemble des espèces végétales introduites se sont développées sur les parcelles du site pollué. Ce résultat permet ainsi de valider le choix des espèces effectué à partir des observations sur site et des travaux antérieurs. Dans les espèces implantées sur les parcelles polluées expérimentales, *A. capillaris*, *L. corniculatus* et dans une moindre mesure *S. latifolia* et *P. lanceolata* sont celles qui présentent un coefficient de recouvrement le plus élevé. Elles ont su s'adapter à la présence des polluants, elles peuvent

ainsi être considérées comme des pseudométallophytes tolérantes à une pollution polymétallique. L'apport de la grenaille de fer a favorisé le développement du couvert végétal en augmentant la biomasse végétale et la diversité floristique. La fixation des ETM et en particulier de l'As sur les oxyhydroxydes de fer formés à partir de la grenaille de fer zerovalent a donc réduit la toxicité du sol et ainsi permis le développement d'un couvert végétal dense et homogène. L'ajout de compost à la grenaille de fer n'a pas permis d'observer un développement significativement plus important de la végétation. Cette observation pourrait être la conséquence d'un lessivage de l'amendement organique apporté sur les parcelles polluées.

Le transfert et le stockage d'une partie des polluants métalliques et métalloïdes dans la biomasse aérienne de la végétation s'est révélé plus importants dans la végétation introduite que dans la végétation spontanée du site. De fait, le risque de transfert des contaminants dans la chaîne alimentaire est plus significatif. La stabilisation des métaux au niveau du sol rhizosphérique par l'apport de grenaille de fer a permis de limiter ce transfert. Cependant, les concentrations de la plupart des ETM mesurées dans les feuilles des plantes cultivées sur les parcelles expérimentales du site pollué dépassent les seuils réglementaires admis (Tableau III.18), notamment pour l'As, l'Sb et le Cd. Un travail supplémentaire sera donc nécessaire pour réduire le transfert des polluants vers les parties aériennes de la végétation. Celui-ci pourra être réalisé par l'apport d'une plus grande quantité de grenaille de fer permettant d'obtenir un ratio molaire $[Fe]/[As]$ plus élevé (Xenidis *et al.*, 2010). Par ailleurs, Ruttens et son équipe (2006), ont observé une stabilisation efficace des métaux et donc un faible transfert vers la végétation en présence de grenaille de fer et de compost mais avec un ajout supplémentaire de cendres cycloniques.

Enfin, le type de couvert végétal peut avoir une influence sur l'accumulation des métaux dans les parties aériennes. En effet, les résultats obtenus avec la végétation inféodée au site ont montré une réduction importante du facteur de translocation limitant ainsi le stockage des ETM dans les feuilles. L'utilisation d'écotypes métallicoles des espèces sélectionnées pourrait ainsi permettre de limiter ce phénomène de transfert.

Ces travaux basés sur les résultats de la première année d'expérimentation sont très encourageants et ont permis une stabilisation efficace des ETM au niveau du sol rhizosphérique. Celle-ci est la condition obligatoire pour limiter la toxicité du sol et la lixiviation des polluants et ainsi faciliter l'implantation d'un couvert végétal permettant d'éviter le phénomène d'érosion du sol. Cependant, une étude à plus long terme du procédé est nécessaire pour évaluer la pertinence de ce procédé de phytostabilisation.

Conclusion et perspectives

Dans une démarche de protection des sols et des organismes vivants, la mise en place d'une technologie de phytoréhabilitation de sites pollués participe à limiter les risques que peuvent engendrer la contamination des sols pour la biodiversité, la santé de l'Homme et le développement économique et urbanistique au niveau régional. De fait, la tolérance des végétaux aux contraintes environnementales et plus particulièrement à la pollution du sol par les ETM est indispensable à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidée pour le traitement des zones polluées qu'elles soient d'origine industrielle, minière ou agricole. La compréhension des mécanismes de toxicité aux ETM est donc nécessaire pour permettre de cibler l'action des polluants et ainsi sélectionner les espèces végétales tolérantes pouvant être utilisées dans des procédés de dépollution. Ainsi, l'étude des différentes réponses des plantes face à une pollution métallique permet de sélectionner les espèces les plus résistantes pour un procédé de phytoréhabilitation.

Un des objectifs majeurs de cette étude est d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance aux ETM et leur impact au niveau physiologique et biochimique. Ainsi, ce travail a permis d'analyser le comportement de quatre espèces végétales, *Solanum nigrum*, *Agrostis capillaris*, *Vicia faba* et *Cannabis sativa*, sur un sol pollué essentiellement à l'As, mais également par le Pb, Sb, Cd et Cu. L'étude de l'activité photosynthétique a montré un impact physiologique de ces ETM plus ou moins marqué sur les quatre espèces végétales cultivées sur sol pollué en conditions contrôlées. En effet, l'étude des mécanismes de la photosynthèse a mis en évidence une réduction de l'activité photosynthétique entraînant, de fait, une perturbation de la croissance des plantes plus ou moins importante en fonction de leur capacité à tolérer les polluants métalliques. *V. faba* a montré au cours de sa culture sur sol comme en hydroponie une sensibilité importante aux polluants métalliques et métalloïdes. *A. capillaris*, dont les graines utilisées étaient des écotypes non métalliques, a souffert de la présence des polluants notamment avec un ralentissement marqué de l'activité photosynthétique et une réduction de sa croissance sur sol pollué. De même, *C. sativa*, malgré une activité photosynthétique faiblement impactée par les polluants, a montré une réduction significative de la biomasse aérienne après sa culture sur sol pollué. Au contraire, *S. nigrum* présente, malgré l'utilisation d'écotypes non métalliques, une capacité à tolérer et à se développer sur sol pollué par les ETM. Elle peut être considérée comme une espèce tolérante aux ETM et plus particulièrement à l'As, celle-ci étant mise en évidence par sa culture en solution hydroponique enrichie en As inorganique.

Pour tolérer et se protéger des polluants métalliques, les espèces végétales ont privilégié le stockage des ETM dans leur système racinaire permettant de limiter leur transfert

vers les parties aériennes, siège de nombreuses réactions métaboliques. *C. sativa* a limité la toxicité des polluants par un mécanisme d'exclusion racinaire lui permettant de limiter l'absorption des ETM. Cependant, l'altération du système racinaire chez cette espèce a provoqué une réduction de l'absorption de nutriments et des flux hydriques au sein de la plante limitant, de fait, la production de biomasse.

L'étude menée en hydroponie en présence d'As sur *S. nigrum*, espèce définie comme tolérante à l'As, et *V. faba*, espèce sensible, a permis de cibler l'action de ce polluant, majoritaire dans le sol du site industriel d'Auzon, au niveau physiologique et biochimique. Cette étude a permis de constater une action de l'As sur le fonctionnement des photosystèmes, limitant l'absorption lumineuse et le transfert des électrons pour le processus photosynthétique. Il a aussi mis en évidence l'impact de ce polluant sur l'activité oxygénase et carboxylase de la Rubisco. Ces réactions en chaîne observées en présence d'As sont accompagnées d'une peroxydation des lipides membranaires et particulièrement des lipides chloroplastiques composés essentiellement d'acides gras insaturés. Les perturbations engendrées au niveau des membranes accentuent le dysfonctionnement des photosystèmes présents dans la membrane. L'étude des deux formes inorganiques de l'As, l'arsénite et l'arséniate, montre, d'une part, une toxicité plus élevée de l'As(III) que de l'As(V), et, d'autre part, une action différente de l'As en fonction de son degré d'oxydation. Alors que les photosystèmes semblent plus sensibles à l'arséniate, l'inhibition de la Rubisco est plus marquée en présence d'arsénite. La compréhension des mécanismes d'absorption, de détoxification et *in fine* de stockage pourrait permettre de mieux appréhender la toxicité de chacune des deux formes arséniées chez les plantes. En effet, le degré d'oxydation de l'As est un paramètre important dans la prise en charge de ce polluant au sein de la plante et dans sa complexation et sa séquestration dans les systèmes vacuolaires. L'étude de la spéciation et de la distribution de l'As dans la plante, déterminées à l'aide d'une HPLC couplée à une ICP-MS, pourrait donner des indications sur la capacité des plantes à tolérer l'As. Par ailleurs, l'étude, sur des espèces sensibles et tolérantes à l'As, de l'activité de l'arsenate réductase (AR), qui permet la réduction de l'arséniate en arsénite dans les racines des plantes, permettrait de déterminer plus précisément le rôle de cette enzyme dans la tolérance à l'As. Cette étude pourrait être complétée par la caractérisation du fonctionnement du métabolisme antioxydant avec, d'une part, l'étude des activités enzymatiques (SOD, GR, CAT, APX, DHAR) et, d'autre part, l'étude de l'expression des gènes par qPCR ce qui pourrait permettre de déterminer précisément les enzymes jouant un rôle prépondérant dans la tolérance à l'As. La culture d'*A. capillaris* présentant des écotypes métallicoles reconnus pour leur tolérance à l'As et des

écotypes sensibles à la pollution pourrait permettre d'approfondir les réponses biochimiques des plantes aux polluants et de cibler précisément l'action des polluants au sein de la plante en fonction de la sensibilité à l'As et en s'affranchissant des variabilités inter espèces.

Les connaissances acquises en conditions contrôlées ont permis d'envisager un procédé de phytostabilisation aidée d'une zone polluée, la friche industrielle de la Vieille Usine d'Auzon, suite à la sélection d'espèces tolérantes et reconnues comme métallobytes. Ce travail a débouché sur des résultats très prometteurs suite à la mise en place d'un couvert végétal diversifié adapté à la pollution et qui, par le développement d'un réseau racinaire dense, a permis de limiter la mobilité des éléments métalliques et métalloïdes. L'ajout de grenaille de fer au sol a accentué la réduction de la disponibilité de certains polluants tels que l'As et dans une moindre mesure de Sb. De plus, il a augmenté la biomasse et la diversité de la végétation. L'apport de matière organique a permis d'enrichir le sol en élément minéraux et organiques et ainsi faciliter l'implantation du couvert végétal. Cette méthode a ainsi permis de réduire la biodisponibilité des polluants dans l'horizon de surface considéré comme le plus contaminé et le plus exposé. Le développement d'un couvert végétal dense a donc permis de limiter le transfert des polluants dans les milieux voisins ainsi qu'au niveau de la chaîne trophique, et d'éviter l'érosion du sol. Sur le plus long terme, il permettra une réintégration paysagère du site qui pourra ainsi être utilisé pour une autre activité qualifiée de non sensible. Cependant, l'apport de ces amendements a entraîné une modification des paramètres physico-chimiques du sol et particulièrement une réduction de pH pouvant être à l'origine de la remobilisation de certains cations métalliques tel que le Cd. Ce procédé de phytostabilisation aidée pourrait donc être complété par l'ajout de chaux au sol permettant de tamponner la baisse de pH et favorisant, de fait, la fixation des ETM en excès dans le sol. La combinaison d'amendements au sol dans le traitement d'une pollution polymétallique semble donc être la solution la plus efficace pour permettre de limiter la toxicité de l'ensemble des polluants métalliques et métalloïdes présents dans le sol. Une étude à plus long terme de cette technique de phytostabilisation aidée serait nécessaire pour observer, d'une part, l'évolution du couvert végétal et son implantation dans la durée et, d'autre part, d'étudier l'évolution de la spéciation chimique des ETM sur un cycle annuel ainsi que sur plusieurs cycles de végétation. Par ailleurs, l'étude des interactions entre les micro-organismes et les plantes permettrait de mieux appréhender la spéciation des ETM au niveau rhizosphérique. Ainsi, il serait intéressant d'envisager l'impact des amendements sur les structures et l'activité microbienne au niveau du sol rhizosphérique et évaluer *in fine* l'impact des microorganismes sur la phytotoxicité des éléments dans le sol.

Références bibliographiques

A

- Abedin, M.J., Cresser, M.S., Meharg, A.A., Feldmann, J., Cotter-Howells, J., 2002. Arsenic Accumulation and Metabolism in Rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36 (5), p. 962-968.
- Abercrombie, J.M., Halfhill, M.D., Ranjan, P., Rao, M.R., Saxton, A.M., Yuan, J.S., Stewart Jr, C.N., 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biology*, vol. 8, p.1-15.
- Abreu, H.S., Maria, M.A., Reis, J.L., 2001. Dual oxidation ways toward lignin evolution. *Florestae Ambiente*, vol. 8, p. 207-210.
- Adams, W.W.I., Zarter, C.R., Mueh, K.E., Amiard, V.S.E., Demmig-Adams, B., 2005. Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. *In* B Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Mattoo, A.K. Eds, *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 49-64.
- ADEME, 2006. Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation. 92 p.
- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in the Terrestrial Environments. *Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals* (2nd Ed). Springer Verlag, New York, 866 p.
- AFNOR, 1994. Le Dictionnaire de l'environnement. Les termes normalisés. Ed. AFNOR, Paris La Défense, 307 p.
- AFNOR, 1999. Qualité des sols. Recueil de normes françaises. 4^{ème} édition. AFNOR Ed., Paris-La Défense, 2 volumes, 566 et 408 p.
- AFNOR, 2003. NF X31-107. Qualité du sol – Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol - Méthode à la pipette. Propriétés physiques des sols, AFNOR Ed., Paris, 20 p.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Kim, K.H., Alam, I., Lee, S.H., Lee, K.M., Lee, H., Lee, B.H., 2010. Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*, vol. 78 (3), p. 224-231.
- Akai, J., Izumi, K., Fukuhara, H., Masuda, H., Nokano, S., Yoshimura, T., Ohfuji, H., Anawar, H.M., Akaï, K., 2002. Mineralogical and geomicrobiological investigations on groundwater arsenic enrichment in Bangladesh. *Appl. Geochem.*, vol. 19, p. 215-230.
- Akter, K.F., Owens, G., Davey, D.E., Naidu, R., 2005. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 184, p. 97-149.
- Alam, M.G., Snow, E.T., Tanaka, A., 2003. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *Sci Total Environ.*, vol. 308 (1-3), p. 83-96.
- Alkorta, I., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2010. Phytostabilization of Metal Contaminated Soils. *Reviews on Environmental Health*, vol. 25 (2), p. 135-146.

Alvarenga, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Cunha-Queda, A.C., 2008. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Science of The Total Environment*, vol. 406 (1-2), p. 43-56.

Andrés, M., 2005. Les plantes indicatrices des sols. *Primaterra*, 4 p.

Antonetti, P., Kessler, F., Brugel, E., 2006. Atlas de la flore d'Auvergne. *Biotope Ed.*, 984 p.

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 55, p. 373-399.

Arnetoli, M., Vooijs, R., Bookum, V.T., Galardi, F., Gonnelli, G., Gabbrielli, R., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 2008. Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration. *Environmental Pollution*, vol. 152, p. 585-591.

Arrêté du 5 août 2003 modifiant l'arrêté du 12 janvier 2001 fixant les teneurs maximales pour les substances et produits indésirables dans l'alimentation des animaux. *Journal Officiel République Française*, vol. 189, 17 août 2003.

ATSDR, 2007. Toxicological Profile for arsenic. *Agence for Toxic Substances and Diseases Registry*. Atlanta, GA., 559 p.

Aubert, D., Stille, P., Probst, A., 2001. REE fractionation during granite weathering and removal by waters and suspended loads: Sr and Nd isotopic evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 65, p. 387-406.

Avidano, L.E., Gamalero, G., Cossa, P., Carraro, E., 2005. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Applied Soil Ecol.*, vol. 30, p. 21-33.

B

Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., Kizek, R., 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ. Chem. Lett.*, vol. 6, p. 189-213.

Baird, C., 1999. Conclusion about heavy metals. Baird, C. & Cann, M. Ed., *Environmental Chemistry*. 2nd edition. New York: W.H. Freeman and Co, p. 381-418.

Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). *Références et stratégie d'interprétation*. INRA Éditions, Paris, 410 p.

Baize, D., 2007. Les Éléments Traces Métalliques (ETM) dans les SOLS. INRA - Orléans Ed., 16 p.

Baize, D., 2010. Information sur les éléments traces dans les sols en France État au 18 août 2010. INRA Editions, 5 p.

Baker, A.J.M., Walker, P.L., 1990. Eco-physiology of metal uptake by tolerant plants, CRC Press, Boca Raton, p. 155-178.

Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C., 2000. Metal hyperaccumulator plants : a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In : Phytoremediation of contaminated soil and water, Terry N. et Bañuelos G. (eds), Lewis Publisher, Boca Raton, FL, p. 85-107.

Bandyopadhyay, B.K, Sarkar, P., Sen H.S., Sanyal, S., 2004. Influence of soil properties on arsenic availability in soil. J. Indian Soc. Soil Sci., vol. 52, p. 50-55.

Barbaste, M., 2004. Analyse des teneurs en métaux dans les végétaux - Pratiques de laboratoire d'analyses. USRAVE, Bordeaux, 2 p.

Barbier, J, 2001. Occurrences naturelles de l'arsenic en France : roches, sols, milieux associés. Les techniques de l'industrie minière, vol. 11, p. 51-66.

Baroni, F., Boscagli, A., DiLella, L.A., Protano, G., Riccobono, F., 2004. Arsenic in soil and vegetation of contaminated areas in southern Tuscany (Italy). J. Geochem. Explor., vol. 81, p. 1-14.

Batley, G.E., 1989. Collection, preparation and storage of samples for speciation analysis. In "Trace Element Speciation, Analytical Methods and Problems", G.E. Batley Ed., CRC Press Inc, Florida, 24 p.

Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. Soil Biol. Biochem., vol. 35, p. 1183-1192.

Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., 2002. Fiche Radionucléide - Antimoine 125 et environnement. IRSN - Direction de l'Environnement et de l'Intervention - Service d'Etude du Comportement des Radionucléides dans les Ecosystèmes, 25 p.

Bech, J., Corrales, I., Tume, P., Barceló, J., Duran, P., Roca, N., Poschenrieder, C., 2012. Accumulation of antimony and other potentially toxic elements in plants around a former antimony mine located in the Ribes Valley (Eastern Pyrenees). Journal of Geochemical Exploration, vol.113, p. 100-105.

Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Clemente, R., Lepp, N., Dickinson, N., 2010. Mobility of arsenic, cadmium and zinc in a multi-element contaminated soil profile assessed by *in-situ* soil pore water sampling, column leaching and sequential extraction. Environmental Pollution, vol. 158, p. 155-160.

Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol., vol. 17, p. 21-34.

Bennett, R.L., Malamy, M., 1970. Arsenate resistant mutants of *Escherichia coli* and phosphate transport. Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 40, p. 469-503.

Benson, L.M., Porter, E.K., Peterson, P.J., 1981. Arsenic accumulation, tolerance, and genotypic variation in plant on arsenical mine wastes in South-West England. *J. Plant Nutr.*, vol. 3, p. 655-666.

Ben Youssef, N., Nouairi, I., Ben Temime, S., Taamalli, W., Zarrouk, M., Ghorbal, M.H., Ben Miled Daoud, D., 2005. Effets du cadmium sur le métabolisme des lipides de plantules de colza (*Brassica napus* L.). *C. R. Biologies*, vol. 328, p. 745-757.

Benzaazoua, M., Marion, P., Picquet, I., Bussière, B., 2002. Stabilisation et solidification de résidus miniers sulfo-arséniés dans des remblais cimentés en pâte. Symposium sur l'environnement et les mines : Défis et perspectives, Rouyn-Noranda, 13 p.

Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Féraud, J.F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, vol. 33 (2), p. 112-116.

Bes, C., 2008. Phytoremédiation des sols d'un site de traitement du bois contaminés par le cuivre, Thèse de l'Université de Bordeaux I, 299 p.

Bhattacharjee, H., Rosen, B.P., 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In: Nies DH, Silver S, Eds. *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 371-406.

Bhattacharya, P., Welch, A.H., Stollenwerk, K.G., McLaughlin, M.J., Bundschuh, J., Panaullah, G., 2007. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Science of the Total Environment*, vol. 379, p. 109-120.

Bhumbla, D.K., Keefer, R.F., 1994. Arsenic mobilization and bioavailability in soils. Dans "Arsenic in the Environment", Ed. Nriagu J.O., J. Wiley & Sons, Michigan, p. 51-82.

Bienert, G.P., Schüssler, M.D., Jahn, T.P., 2008. Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends Biochem. Sci.*, vol. 33, p. 20-26.

Bigot, A., Fontaine, F., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N., 2007. Effect of the herbicide flumioxazin on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Chemosphere*, vol. 67, p. 1243-1251.

Bispo, A., Arrouays, D., 2008. Les réseaux de surveillance de la qualité des sols en France et en Europe, vers l'intégration de paramètres biologiques ? Académie d'Agriculture de France. Séance du 30 janvier 2008. 2 p.

Bisson, M., 2010. Arsenic et ses dérivés inorganiques - Version n°4 - INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, 124 p.

Bissen, M., Frimmel, F.H., 2003. Arsenic - a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochim Hydrobiol*, vol. 31, p. 9-18.

Blaise, G., Vanhootehem, O., De La Brassinne, M., 2007. Les intoxications arsénicales : comment et pourquoi les diagnostiquer. *Rev Med Liège*, vol. 62 (2), p. 94-96.

Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Raskin, I. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, vol. 3, p. 860-865.

Bleeker, P.M., Hakvoort, H.W.J., Blik, M., Souer, E., Schat, H., 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant Journal*, vol. 45, p. 917-929.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botany*, vol. 91, p. 179-194.

Bonnier, G., De Layens, G., 1986. Flore de Bonnier : Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique. Belin Ed., Paris, 425 p.

Bourrelier, P.H., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion. CR Acc Sci, Ed. Lavoisier, Paris, 42 p.

Bose, U., Rahman, M., Alamgir, M., 2010. Arsenic toxicity and speciation analysis in ground water samples: a review of some techniques. *International Journal of Chemical Technology*, p. 1996-3416.

Bowen, H.J.M., 1979. Environmental chemistry of the elements. Academic Press London, 333 p.

Brandstetter, A., Lombi, E., Wenzel, W.W., Adriano, D.C., 2000. Arsenic contaminated soils: I. risk assessment. *In: Remediation engineering of contaminated soils*. Wise, D.L., Torantolo, D.J., Cichon, W.J., Inyang, H.I., Stottmeister, U., eds.. New York, Marcel Dekker, p. 715-737.

Braun-Blanquet, J., 1928. Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde. Biol., Studienbücher, vol. 7, 330 p.

Braun-Blanquet, J., 1952. Les groupements végétaux de la France Méditerranée. C.N.R.S. Montpellier.

Braun-Blanquet, J., 1964. Pflanzensoziologie. Grundzüge der vegetationskunde. Springer, Wien – New York, 865 p.

Bréchnignac, F., Deville-Cavelin, G., 2002. Fiche Radionucléide - Fer 59 et environnement. IRSN, 14 p.

BRGM, 2000. Site de la Vieille Usine à Auzon - Recommandations en vue de la réhabilitation du site. BRGM/RP-50521-FR, 31 p.

BRGM, 2002. Gestion des sites (potentiellement) pollués - Annexe 5C : Valeurs guides en matière de pollution des eaux et des sols. N°rap 13 p.

Briat, J.F., 2010. Arsenic tolerance in plants: "Pas de deux" between phytochelatin synthesis and ABCC vacuolar transporters. *PNAS*, vol. 107 (49), p. 20853-20854.

Brooks, R., Chambers, M., Nicks, L., Robinson, B., 1998. Phytomining. Trends Plant Sci, vol. 3, p. 359-362.

Brooks, W.E., 2012. Minerals Information: Arsenic. United States Geological Survey Mineral (USGS), 2 p.

Brown, S., Christensen, B., Lombi, E., McLaughlin, M., McGrath, S., Colpaert, J., Vangronsveld, J., 2005. An inter-laboratory study to test the ability of amendments to reduce the availability of Cd, Pb, and Zn *in situ*. Environmental Pollution, vol. 138, p. 34-45.

Bur, T., 2008. Impact anthropique sur les éléments traces métalliques dans les sols agricoles de Midi-Pyrénées. Implications en termes de limites de charges critiques. Thèse de l'Université de Toulouse, 373 p.

Burlo, F., Guijarro, I., Carbonell-Barrachina, A.A., Valero, D., Martinez-Sanchez, F., 1999. Arsenic Species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants. J. Agric. Food Chem., vol. 47, p. 1247-1253.

Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques - Guide méthodologique Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01a, 138 p.

C

Cai, Y., Ma, L.Q., 2003. Metal tolerance, accumulation and detoxification in plants with emphasis on arsenic in terrestrial plants. In Cai Y. and Braids O. Ed., Biogeochemistry of environmentally important trace elements. Oxford University Press, p. 95-114.

Calvet, R., 2003. Le sol - Propriétés et fonctions - Tome 1 : Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. France Agricole Ed., Paris, 455 p.

Cancès, B., 2004. Spéciation et comportement géochimique de l'arsenic dans un sol contaminé par une friche industrielle. Thèse de l'Université Paris 7 - Denis Diderot, 195 p.

Cancès, B., Juillot, F., Morin, G., Laperche, V., Alvarez, L., Proux, O., Hazemann, J.L., Brown, Jr.G.E., Calas, G., 2005. XAS evidence of As(V) association with iron oxyhydroxides in a contaminated soil at a former arsenical pesticide processing plant. Environ. Sci. Technol., vol. 39, p. 9398-9405.

Cao, H., Jiang, Y., Chen, J., Zhang, H., Huang, W., Li, L., Zhang, W., 2009. Arsenic accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgi and its effects on plant growth and pharmaceutical components. Journal of Hazardous Materials, Volume 171, Issues 1-3, p. 508-513.

Cao, X., et Ma, L.Q., 2004. Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. Environmental Pollution, vol. 132, p. 435-442.

Capilla, X., 2005. Dynamique de transfert du cadmium et du zinc au sein des dépôts de sédiments de curage végétalisés. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 182 p.

Cappuyns, V., Van Herreweghe, S., Swennen, R., Ottenburgs, R., Deckers, J., 2002. Arsenic pollution at the industrial site of Reppel-Bocholt (north Belgium). *Sci. Total Environ.*, vol. 295, p. 217-240.

Carbonell, A.A., Aarabi, M.A., DeLaune, R.D., Gambrell, R.P., Patrick Jr., W.H., 1998. Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. *The Science of the Total Environment*, vol. 217, p. 189-199.

Castaldi, P., Santona L., Melis, P., 2005. Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere*, vol. 60 (3), p. 365-371.

Caussy, D., 2003. Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56 (1), p. 164-173.

Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées – Cas des sols viticoles contaminés par les fongicides. Thèse de l'Université d'Aix-Marseille. 165 p.

Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Li, Y.M. Method for phytomining of nickel, cobalt and other metals from soil. United States Patent 5711784, 27 Jan. 1998.

Chassin, P., Baize, D., Cambier, Ph., Sterckeman, T., 1996. Les éléments traces métalliques et la qualités de sols - Impact à moyen et à long terme. *Etude et gestion des sols*, vol. 3, 4, p. 297-306.

Chatain, V., 2004. Caractérisation de la mobilisation potentielle de l'arsenic et d'autres constituants inorganiques présents dans les sols issus d'un site minier aurifère. Thèse de l'Institut National de Science Appliquée de Lyon, 189 p.

Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, W.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., Shen, Z.X., Sun, G.L., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S.J., Wang, Z.Y., Chen, Z., 1996. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic Leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α proteins. *Blood*, vol. 88 (3), p. 1052-1061.

Chettri, M.K., Cook, C.M., Vardaka, E., Sawidis, T., Lanaras, T., 1998. The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 39 (1), p. 1-10.

Chirenje, T., Ma, L.Q., 1999. Effects of acidification on metal mobility in a papermill-ash amended soil. *Journal of Environmental Quality*, vol. 28, p. 760-767.

Christophersen, H.M., Smith, S.E., Pope, S., Smith, F.A., 2009. No evidence for competition between arsenate and phosphate for uptake from soil by medic or barley. *Environment International*, vol. 35 (3), p. 485-490.

Chugh, L.K., Shawney, S.K., 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 37, p. 297-303.

Ci, D., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., Cao, W., 2009. Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. *Chemosphere*, vol. 77 (11), p. 1620-1625.

Citeau, L., 2008. Transfert eaux-sols-plantes de micropolluants : état des connaissances et application aux eaux de ruissellement urbaines. Rapport pour l'Agence de l'Eau Seine Normandie, INRA Ed., 103 p.

Citeau, L., Bispo, A., Bardy, M., King, D., 2008. Gestion durable des sols. Ed Quae, Versailles, 320 p.

Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, vol. 7 (7), p. 309-315.

Clemens, S., 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*, vol. 163 (3), p. 319-332.

Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, vol. 88 (11), p.1707-1719.

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 53, p.159-182.

Commission des Communautés Européennes (CEE), 2006. Directive du Parlement Européen et du conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE, COM(2006)232, Bruxelles, 31 p.

Commission des Communautés Européennes (CEE), 2006. Stratégie thématique en faveur de la protection des sols. Communication de la commission au conseil, au parlement européen, au comité économique et social européen et au comité des régions, COM(2006)231 final, Bruxelles, 13 p.

Connelly, N.G., Damhus, T., Hartshorn, R.M., Hutton, A.T., 2005. Nomenclature of inorganic chemistry - Recommendation 2005. Published for the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) by The Royal Society of Chemistry, UK, 377 p.

Cornic, G., 2007. Effets de la lumière sur la photosynthèse et sur l'appareil photosynthétique. Adaptation à l'éclairement de croissance - Photoinhibition. ESE - Université Paris-Sud 11, Agro Paris-Tech CNRS, 62 p.

Cornu, S., Clozel, B., 2000. Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels - Analyse critique. *Etude et Gestion des Sols*, vol. 7 (3), p. 179 - 189.

Coronel, A., 2005. Prairies : Choisir les espèces adaptées. *Jura agricole et rural*, p. 11-12.

Coulibaly, A.S., Monde, S., Aka, K., 2010. Biodisponibilité et spéciation chimique des éléments traces métalliques dans un environnement lagunaire confiné : la Baie De Bietry. *International Journal of African Studies*, ISSN 1451-213X (3), p.41-52.

Cuadrado, V., Merini, L., Giulietti, A.M., 2010. Phytostimulation of atrazine degradation by alfalfa (*Medicago sativa*, L.) extracts and exudates, *Journal of Biotechnology*, vol. 150 (1), p. 251.

D

Dahmani-Muller, H., Van Oort, F., Balabane, M., 2001. Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grown on an unpolluted soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environmental Pollution*, vol. 114, p. 77-84.

Dal Corso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A., 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 50, p. 1268-1280.

Damour, G., 2008. Bases théoriques et approches expérimentales de la modélisation des effets de la contrainte hydrique sur les échanges gazeux foliaires du manguier et du litchi. Thèse de l'Université de la Réunion, 283 p.

Darmendrail, D., Baize, D., Barbier, J., Freyssinet, P., Mouvet, C., Salpeteur, I., Wavrer, P., 2000. Fond géochimique naturel : état des connaissances à l'échelle nationale. BRGM/RP-50518-FR, 93 p.

Darrah, P.R., Jones, D.L., Kirk, G.J.D., Roose, T., 2006. Modelling the rhizosphere: a review of methods for 'upscaling' to the whole-plant scale. *European J Soil Science*, vol. 57, p. 13-25.

Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M., 2000. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, vol. 156, p. 659-665.

Dazy, M., 2008. Caractérisation de la colonisation spontanée par les plantes de sols pollués - Rôle des systèmes cellulaires de détoxification. Thèse de l'Université de Metz, 295 p.

Dazy, M., Jung, V., Férard, J.F., Masfarau, J.F., 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere*, vol. 74 (1), p. 57-63.

Delabays, N., Acay, A., Mermillod, G., 1998. Recherche d'espèces végétales à propriétés allélopathiques. *Revue Suisse Viti Arbo Horti*, vol. 30 (6), p. 383-387.

Delaunoy, A., Ferrie, Y., Bouche, M., Colin, C., Rionde, C., 2008. Guide pour la description et l'évaluation de la fertilité des sols. Chambre d'Agriculture du Tarn - INRA de Montpellier, 37 p.

De Marco, A., De Simone, C., Raglione, M., Lorenzoni, P., 1995. Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, vol. 344 (1-2), p. 5-12.

Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Laplace J., Leyval C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces, influence des micro-organismes du sol. Lavoisier Ed., Paris, 279 p.

Desnos, T., 2008. Root branching responses to phosphate and nitrate. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 11 (1), p. 82-87.

Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 2004. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV (ed) *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystem*. Narosa Publishing House, New Delhi, p. 127-145.

Dhankher, O.P., Rosen, B.P., McKinney, E.C., Meagher, R.B., 2006. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *PNAS*, vol. 103 (14), p. 5413-5418.

Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., Sharma, S., Kumar, R., Mehta, D., 2011. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74 (6), p. 1678-1684.

Dictor, M.C., Baranger, P., Chéry, L., Michel, K., Barbier, J., Clozel, B., Touzé, S., Le Gall, A.C., Brosselin, P., 2004. Synthèse des travaux R&D en France (1999-2004) sur la thématique arsenic. BRGM/RP-53252-FR, BRGM Ed., 130 p.

Directive 2003/100/CE de la Commission du 31 octobre 2003 modifiant l'annexe I de la directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux. *Journal officiel de l'Union européenne* L 285/33, 5 p.

Domènech, J., Mir, G., Huguet, G., Capdevila, M., Molinas, M., Atrian, S., 2006. Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie*, vol. 88 (6), p. 583-593.

DRIRE, 2005. Note sur l'utilisation des VDSS et des VCI. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Toulouse, 2p.

Dubourguier, H. C., Petit, D., Deram, A., Logeay, C., 2001. Le phytomanagement, Eléments de synthèse. Pôle de compétence Sites et Sédiments pollués, Lille, 50 p.

Duker, A.A., Carranza, E.J., Hale, M., 2005. Arsenic geochemistry and health. *Environ Int.*, vol. 31 (5), p. 631-41.

Duquesnoy, I., Etude agrophysiologique, biochimique, protéomique de l'impact de l'arsenic inorganique pentoxyde et trioxyde chez 4 espèces végétales. Thèse de l'Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, 226 p.

Duquesnoy, I., Goupil, P., Nadaud, I., Branlard, G., Piquet-Pissaloux, A., Ledoigt, G., 2009. Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Science*, vol. 176, p. 206-213.

E

Eckhardt, U., Grimm, B., Hörtensteiner, S., 2004. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology*, vol. 56, p. 1-14.

EEA, 2007. Progress in management of contaminated sites (CSI015). European Environment Agency.

Eisenlohr, L., 2000. Ancienne usine de produits phytosanitaires. Comptes rendu de la campagne d'échantillonnage - Sols et eaux souterraines. CNRSSP/00/04, 10 p.

El Mufleh, A., Béchet, B., Ruban, V., 2010. Etude des phases porteuses des polluants métalliques dans des sédiments de bassins d'infiltration des eaux pluviales. Novatech, Session 2.8, 11 p.

EPA, 1996. Soil Screening Guidance: User's Guide - 2^{ème} édition. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/540/R-96/018, 49 p.

EPA, 1998. A Citizen's Guide to Phytoremediation, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, EPA 542-F-98-011, 2 p.

Ernst, W.H.O., 1974. Schwermetallvegetation der Erde. Fischer Verlag, Stuttgart, 194 p.

Ernst, W.H.O., 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants, *For. Snow Landsc. Res.*, vol. 80 (3), p. 251-274.

Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A., 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, Vol. 68 (6), p. 989-1003.

F

Farineau, J., Morot-Gaudry, J.F., 2011. La photosynthèse - Processus physiques, moléculaires et physiologiques. Quae Ed., Paris, 394 p.

Farrell, M., Perkins, W.T., Hobbs, P.J., Griffith, G.W., Jones, D.L., 2010. Migration of heavy metals in soil as influenced by compost amendments, *Environmental Pollution*, vol. 158, p. 55-64.

Faucon, P.M., 2009. Ecologie et biologie de la conservation des métallophytes - Le cas de *Crepidiorhodon perennis* et *C. tenuis* (Scrophulariaceae) des sols cupro-cobaltifères du Katanga. Thèse de l'Université Libre de Bruxelles, 220 p.

Fayiga, A.O., Ma, L.Q., Zhou, Q., 2007. Effects of plant arsenic uptake and heavy metals on arsenic distribution in an arsenic-contaminated soil. *Environmental Pollution*, vol. 147. p. 737-742.

Fengxiang, X.H., Su, Y., Monts, D.L., Plodinec, M.J., Banin, A., 2003. Assessment of global industrial age anthropogenic arsenic contamination. *Naturwissenschaften*, vol. 90, p. 395-401.

Fest, E., Temminghoff, E.J.M., Comans, R.N.J., Van Riemsdijk, W.H. 2008. Partitioning of organic matter and heavy metals in a sandy soil: Effects of extracting solution, solid to liquid ratio and pH. *Geoderma*, vol. 146 (1-2), p. 66-74.

Fitz, W.J., Wenzel, W.W., 2002. Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, vol. 99 (3), p. 259-278.

Flexas, J., Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, vol. 89, p. 183-189.

Flotete, A.N., 2010. Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Thèse de l'Université Paul Verlaine de Metz, 245 p.

Förstner, U., 1993. Metal speciation – General concepts and applications. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 51, p. 5-23.

Francesconi, K., Visoottiviseth, P., Sridokchan, W., Goessler, W., 2002. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, vol. 284, p. 27-35.

Fränzle, O., 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecol. Indic.*, vol. 6, p. 114-136.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., Escarré, J., 2006. Specific interactions between local metalicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil*, vol. 282, p. 53-65.

Fu, D., Min, L., 2007. The structure basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins (Review). *Molecular Membrane Biology*, vol. 24, p. 366-374.

G

Gahoonia, T.S., Nielsen, N.E., 2003. Phosphorus (P) uptake and growth of a root hairless barley mutant (bald root barley, *brb*) and wild type in low- and high-P soils. *Plant Cell Environn.*, vol. 26, p. 1759-1766.

Gamborg, O.L., Wetter, L.R., 1975. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada, Gamborg et Wetter Ed., Saskatoon, 110 p.

Gandois, L., Probst, A., Dumat, C., 2010. Modeling trace metal extractibility and solubility in French forest soils by using soil properties. *Eur J Soil Sci.*, vol. 61, p. 271-286.

Garbisu, C., Alkorta, I., 2001. Phytoextraction: A cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Biores Technol.*, vol. 77 (3), p. 229-236.

Garcia-Sanchez, A., Moyano, A., Mayorga, P., 2005. High arsenic content in groundwater of central Spain. *Environ. Geol.*, vol.47, p. 847-854.

Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., 2008. Arsenic pollution sources. *Rev Environ Contam Toxicol.*, vol. 197, p. 17-60.

Garrido, F., Joubert, A., Quemeneur, M., Jouliau, C., D'Hugues, P., Jauzein, M., Leyval, C., Billard, P., 2009. Influence des facteurs environnementaux "sensibles au changement global" sur le transfert de polluants inorganiques (As, Pb, Zn, Cd et Hg) dans les sols, Service Environnement et Procédés Innovants (EPI) - MEDDAT, 28 p.

Gavalda, D., 2001. Devenir des éléments traces métalliques dans les brousses (Luvi-Redoxysol) après épandage de boues granulées. (Thèse de doctorat) INPT-ENSAT. 258 p.

Geislinger, A.E., Goessler, W., Francesconi, K.A., 2002. The marine polychaete *Arenicola marina*: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from sea water. *Mar. Environ. Res.*, vol. 53, p. 37-50.

Geng, C.N., Zhu, Y.G., Tong, Y.P., Smith, S.E., Smith, F.A., 2006. Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, vol. 62, p. 608-615.

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 990, p. 87-92.

Ghosh, A.K., Bhattacharyya, P., Pal, R., 2004. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environment International*, vol. 30 (4), p. 491-499.

Ghosh, M., Singh, S.P., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products. *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 3, p. 1-18.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 48, p. 909-930.

Girouard, E., Zagury, G.J., 2009. Arsenic bioaccessibility in CCA-contaminated soils: influence of soil properties, arsenic fractionation, and particle-size fraction. *Sci Total Environment*, vol. 407 (8), p. 2576-2585.

Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W., 2003. Le sol vivant, deuxième édition revue et augmentée. Ed. Presses polytechnique et universitaires romandes, 568 p.

Goh, K.K, et Lim, T.T., 2004. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere*, vol. 55, p. 849-859.

Goldschmidt, V.M., 1954. *Geochemistry*. Clarendon Press, Oxford, 730 p.

Gonzaga, M.I.S., Gonzaga Santos, J.A., Ma, L.Q., 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, vol. 63 (1), p.90-101.

Gonzaga, M.I., Ma, L.Q., Santos, J.A., Matias, M.I., 2009. Rhizosphere characteristics of two arsenic hyperaccumulating ferns. *Sci Total Environ.*, vol. 407 (16), p 4711-6.

Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O., Hitmi, A., Ledoigt, G., 2009. Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *Journal of Plant Physiology*, vol. 166 (13), p. 1446-1452.

Grispen, V.M.J., Irtelli, B., Hakvoort, H.W.J., Vooijs, R., Blik, T., Ten Bookum, W.M., Verkleij, J.A.C., Schat, H., 2009. Expression of the *Arabidopsis* metallothionein 2b enhances arsenite sensitivity and root to shoot translocation in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 66 (1), p. 69-73.

Gulz, P.A., Gupta, S.K., Schulin, R., 2005. Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. *Plant and Soil*, vol. 272, p. 337-347.

Gupta, A.K., Sinha, S., 2006. Role of *Brassica juncea* (L.) Czern. (var. Vaibhav) in the phytoextraction of Ni from soil amended with fly ash: Selection of extractant for metal bioavailability. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 136 (2), p. 371-378.

H

Hamadani, J.D., Grantham-McGregor, S.M., Tofail, F., Nermell, B., Fangstrom, B., Huda, S.N., Yesmin, S., Rahman, M., Vera-Hernandez, M., Arifeen, S.E., Vahter, M., 2010. Pre and postnatal arsenic exposure and child developments at 18 months of age: A cohort study in rural Bangladesh. *Int. J. Epidemiol.*, vol. 39 (5), p. 1206-1216.

Han, Z.X, Feng, G.Y., Lu, W.Z., 2002. Study on effects of As(III) in environment on wheat sprout and the original researcher of prevention and treatment of arsenic toxicant. *Acta Botanica Boreali - Occidentalia Sinica*, vol. 18, p. 123-128.

Hartley, W., Lepp, N.W., 2008. Effect of *in situ* soil amendments on arsenic uptake in successive harvests of ryegrass (*Lolium perenne* cv Elka) grown in amended As-polluted soils. *Environmental Pollution*, vol. 156, p. 1030-1040.

Hartley, W., Dickinson, N.M., Riby, P., Leese, E., Morton, J., Lepp, N.W., 2010. Arsenic mobility and speciation in a contaminated urban soil are affected by different methods of green waste compost application. *Environmental Pollution*, vol. 158 (12), p. 3560-3570.

Hassinen, H., 2009. Search for metal-responsive genes in plants putative roles in metal tolerance or accumulation. Thèse de l'Université de Kuopio, 83 p.

He, J.Y., Ren, Y.F., Zhu, C., Yan, Y.P., Jiang, D.A., 2008. Effect of Cd on growth, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence of wild and Cd-sensitive mutant rice. *Photosynthetica*, vol. 46 (3), p. 466-470.

Hervé, C., 2006. Bases moléculaires de la réponse au stress et à la défense chez l'algue rouge *Chondrus crispus* et caractérisation d'une nouvelle classe de glutathion-S-transférases. Thèse de l'Université de Rennes I / CNRS, 288 p.

Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M., 2002. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide : Influence of plant growth. Journal of Environmental Quality, vol. 31, p. 564-572.

Heyno, E., Klose, C., Krieger-Liszkay, A., 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. New Phytologist, vol. 179, p. 687-699.

Houba, V.J.G., Novozamsky, I., Lexmond, T.M., Van der Lee, J.J., 1990. Applicability of 0.01 M CaCl₂ as a single extraction solution for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes. Commun. Soil Sci. Plant Anal., vol. 21, 19 et 20, p. 2281-2290.

Hsu, J.H., Lo, S.L., 2000. Characterisation and extractability of copper, manganese, and zinc in swine manure composts. Journal of Environmental Quality, vol. 29 (2), p. 447-453.

Huang, J.H., Matzner, E., 2007. Fluxes of inorganic and organic arsenic species in a Norway spruce forest ffoot, Environmental Pollution, vol. 149, p. 201-208.

Huang, L., Hu, H., Li, X., Li, L.Y., 2010. Influences of low molar mass organic acids on the adsorption of Cd²⁺ and Pb²⁺ by goethite and montmorillonite. Applied Clay Science, vol. 49 (3), p. 281-287.

Hubert, F., Pierre, P., 2003. Guide pour un diagnostic prairial. Ecom-Epub, Caen, 237 p.

Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action Toxicology Letters, Vol. 133 (1), p. 1-16.

I

Inouhe, M., 2005. Phytochelatins. Braz. J. Plant Physiol., vol. 17 (1), p. 65-78.

Inskeep, W.P., McDermott, T.R., Fendorf, S., 2002. Arsenic (V)/(III) cycling in soils and natural waters. In : Environmental chemistry of arsenic. Marcel Dekker, Frankenberger, W.T., (Eds.), New York, p. 183-216.

IPCC, 2007. Climate change 2007: synthesis report, contribution of working groups I, II, and III to the fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate change. Genève, Ed. Pachauri R.K., Reisinger A., IPCC, 104 p..

Isayenkov, S.V., Maathius, F.J.M., 2008. The Arabidopsis thaliana aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. FEBS Letters, vol. 582, p. 1625-1628.

J

Jacotot, B., Le Parco, J.C., 1999. Nutrition et alimentation. 2nd éd. revue et mise à jour, Ed. Masson, Paris, 311 p.

Jacquemin, P., Arguillat, M., Tuphé, R., Le Guen, S., Boisson, J., Pottecher, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Saunal, B., 2006. Réhabilitation du site minier une combinaison du confinement et de la phytostabilisation des sols. Projet ADEME, Travaux n° 831, 11 p.

Jain, A., Poling, M.D., Karthikeyan, A.S., Blakeslee, J.J., Peer, W.A., Titapiwatanakun, B., Murphy, A.S., Raghothama, K.G., 2007. Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, vol. 144, p. 232-247.

Jain, C.K., Ali, I., 2000. Arsenic : occurrence, toxicity and speciation techniques. *Wat. Res.*, vol. 34 (17), p. 4304-4312.

Jain, M., Gadre, R.P., 1997. Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymatic activities in greening maize tissues. *Journal of Water, air and soil pollution*, vol. 93 (1-4), p. 109-115.

Jain, M., Gadre, R.P., 2004. Inhibition of 5-amino levulinic acid dehydratase activity by arsenic in excised etiolated maize leaf segments during greening. *Journal of Plant Physiology*, vol. 161 (3), p. 251-255.

Jana, U., 2009. Etude des interactions entre la plante *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh et le ver de terre *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) : Application à la phytoremédiation de l'arsenic et de l'antimoine. Thèse de l'Université Paris-Est, 275 p.

Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., Le Bras, M., Duffort, S., Peres, L., Berthier, C., Soilihi, H., Raught, B., De The, H., 2010. PML/RAR Oxidation and Arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. *Cancer Cell*, vol. 18, p. 88-98.

Ji, P., Sun, T., Song, Y., Ackland, M.L., Liu Y., 2011. Strategies for enhancing the phytoremediation of cadmium-contaminated agricultural soils by *Solanum nigrum* L. *Environmental Pollution*, vol. 159 (3), p. 762-768.

Jiang, W., Liu, D., 2010. Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biol.*, vol. 10, p. 40-48.

Jolivet, C., Arrouays, D., Boulonne, L., Ratié, C., Saby, N., 2006. Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols de France (RMQS) - Etat d'avancement et premiers résultats. *Etude et Gestion des Sols*, vol. 13 (3), p. 149 - 164.

Jones, A., Montanarella, L., Jones, R., 2005. Soil Atlas for Europe, European Soil Bureau Network, European Commission, Luxembourg, 128 p.

Joubert, A., 2008. Etude de l'effet de facteurs environnementaux sur les processus biogéochimiques de mobilisation de Pb, Zn, Cd, As et Hg dans les sols. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, 333 p.

Jouven, M., 2006. Quels équilibres entre production animale et utilisation durable des prairies dans les systèmes bovins allaitants herbagers ? Une approche par modélisation des interactions conduite-troupeau-ressources. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Paris-Grignon, 271 p.

Jung, M.C., Thornton, I., Chon, H.T., 2002. Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu–W mine in Korea. *Science of The Total Environment*, vol. 295 (1-3), p. 81-89.

Juste, C., 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines, Convention ADEME-INRA, ADEME Ed., 209 p.

Juwarkar, A.A., Yadav, S.K., Kumar, P., Singh, S.K., 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environ. Monit. Assess.*, vol. 145, p. 7-15.

K

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Ratón, 413p.

Kalaji, H.M., Loboda, T., 2007. Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress. *Plant Soil Environ.*, vol. 53 (12), p. 511-516.

Kautsky, H., Appel, W., Amann, H., 1960. Chlorophyllfluorescenz und Kohlensäureassimilation: XIII. Die fluorescenzkurve und die Photochemie der Pflanze. *Biochem Z.*, vol. 332, p. 277-292.

Khadra, A., Pinelli, E., Lacroix, M.Z., Bousquet-Melou, A., Hamdi, H., Merlina, G., Guisresse, M., Hafidi, M., 2012. Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 76 (1), p. 187-192.

Khan, N., Samiullah, A., Singh, S., Nazar, R., 2007. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *J Agron Crop Sci*, vol. 193, p. 435-444.

Khan, I., Ahmad, A., Iqbal, M., 2009. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 72 (2), p. 626-634.

Kim, J.H., Lee, C.H., 2005. In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Plant Science*, vol. 168, p. 1115-1125.

Kizilkaya, R., 2004. Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecological Engineering*, vol. 22 (2), p. 141-151.

Knauer, K., Behra, R., Hemond, H., 1999. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient, *Aquatic Toxicol.*, vol. 46, p. 221-230.

- Koch, I., Wang, L., Ollson, C.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 2000. The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. *Environmental Science and Technology*, vol. 34, p. 22-26.
- Komárek, M., Vaněk, A., Mrnka, L., Sudová, R., Száková, J., Tejnecký, V., Chrastný, V., 2010. Potential and drawbacks of EDDS-enhanced phytoextraction of copper from contaminated soils. *Environmental Pollution*, vol. 158 (7), p. 2428-2438.
- Koo, B.J., Chen, W., Chang, A.C., Page, A.L., Granato, T.C., Dowdy, R.H., 2010. A root exudates based approach to assess the long-term phytoavailability of metals in biosolids-amended soils. *Environmental Pollution*, vol. 158, p. 2582-2588.
- Kotrba, P., Najmanova, J., Macek, T., Ruml, T., Mackova, M., 2009. Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnology Advances*, vol. 27 (6), p. 799-810.
- Krämer, U., 2010. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 61, p. 517-534.
- Krause, G.H., 1988. Photoinhibition of photosynthesis: An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, vol. 74, p. 566-574.
- Krupa, Z., Moniak, M., 1998. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Sci.*, vol. 138, p. 149-156.
- Kuehnelt, D., Lintschinger, J., Goessler, W., 2000. Arsenic compounds in terrestrial organisms. IV. Green plants and lichens from an old arsenic smelter site in Austria. *Applied Organometallic Chemistry*, vol. 14, p. 411-420.
- Kumpiene, J., Castillo, Montesinos, I., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2007. Evaluation of the critical factors controlling stability of chromium, copper, arsenic and zinc in iron-treated soil. *Chemosphere*, vol. 67 (2), p. 410-417.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments. *Waste Management*, vol. 28 (1), p. 215-225.
- Kumpiene, J., Guerri, G., Landi, L., Pietramellara, G., Nannipieri, P., Renella, G., 2009. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after *in situ* aided phytostabilization of a Pb and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72 (1), p. 115-119.
- Kumpiene, J., Mench, M., Bes, C.M., Fitts, J.F., 2011. Assessment of aided phytostabilization of copper-contaminated soil by X-ray absorption spectroscopy and chemical extractions. *Environmental Pollution*, vol. 159, p. 1536-1542.
- Kumpiene, J., Fitts, J.P., Mench, M., 2012. Arsenic fractionation in mine spoils 10 years after aided phytostabilization. *Environmental Pollution*, vol. 166, p. 82-88.

L

Lage-Pinto, F., Oliveira, J.G., Da Cunha, M., Souza, C.M.M., Rezende, C.E., Azevedo, R.A., Vitória, A.P., 2008. Chlorophyll *a* fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 64, (3), p. 307-313.

Lambinon, J., Auquier, P., 1963. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhénanie aixoise. Types chorologiques et groupes écologiques. *Natura Mosana*, vol. 16, p. 113-130.

Lamy, I., 2002. Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols, Orléans.

Laperche, V., Eisenlohr, L., 2001. Echantillonnage d'un site contaminé par l'arsenic. Comparaison de différentes stratégies et représentativité de l'échantillonnage des sols, Rapport CRNSSP01/11/, 33 p.

Laperche, V., Bodéan, F., Dictor, M.C., Baranger P., 2003. Guide méthodologique de l'arsenic appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR, 94 p.

Laperche, V., 2005. Evaluation des performances du spectromètre portable de fluorescence X Niton XL723S (au laboratoire et sur le terrain). RP-53377-FR, 72 p., 41iII., 2 ann.

Larcher, W., 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4 Ed., Springer-Verlag, Berlin, 513 p.

Lauwerys, R., Haufried, V., Hoet, P., Lison, D., 2007. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles - 5^{ème} édition. Elsevier Masson SAS Ed., ISBN : 978-2-294-01418-5, 1216 p.

Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie*, vol. 16, p. 201-215.

Legros, J., 2007. Les grands sols du monde. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 574 p.

Le Guedard, M., Schraauwers, B., Larrieu, I., Bessoule, J.J., 2008. Development of a biomarker for metal bioavailability: the lettuce fatty acid composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 27 (5), p. 1147-1151.

Le Guédard, M., Faure, O., Bessoule, J.J., 2012. Soundness of *in situ* lipid biomarker analysis: Early effect of heavy metals on leaf fatty acid composition of *Lactuca serriola*. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 76, p. 54-59.

Le Guédard, M., Bessoule, J.J. Normes AFNOR X31-233: Qualité du sol - Analyses des acides gras des végétaux comme biomarqueurs de la pollution des sols, AFNOR Ed., *sous presse*.

Leps, J., Hadincova, V., 1992. How reliable are our vegetation analyses. J. Veg. Sci. vol. 3, p. 119-124.

Leupin, O.X., Hug, S.J., 2005. Oxidation and removal of arsenic(III) from aerated groundwater by filtration through sand and zero-valent iron. Water Research, vol. 39 (9), p. 1729-1740.

Lewandowski, I., Schmidt, U., Londo, M., Faaij A., 2006. The economic value of the phytoremediation function – Assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* spp) Agricultural Systems, Vol. 89 (1), p. 68-89.

Li, C.X., Feng, S.L., Shao, Y., Jiang, L.N, Lu, X.Y., Hou, X.L., 2007. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. Journal of Environmental Sciences, vol. 19, p. 725-732.

Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M., Cao, Q., 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. J. Environ. Sci. (China), vol. 19 (5), p. 596-602.

Linger, P., Müssig, J., Fischer, H., Kobert, J., 2002. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. Industrial Crops and Products, vol. 16 (1), p. 33-42.

Liu, N., Lin, Z.F., Lin, G.Z., Song, L.Y., Chen, S.W., Mo, H., Peng, C.L., 2010. Lead and cadmium induced alterations of cellular functions in leaves of *Alocasia macrorrhiza* L. Schott. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 73 (6), p. 1238-1245.

Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Zhu Y.G., 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat. Chemosphere, vol. 61 (2), p. 293-301.

Liu, X., Zhang, S., 2007. Intraspecific differences in effects of cocontamination of cadmium and arsenate on early seedling growth and metal uptake by wheat. Journal of Environmental Sciences, vol. 19, p. 1221-1227.

Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Christie, P., 2007. Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate cocontamination. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 68, p. 305-313.

Lombi, E., Holm, P.E., 2010. Metalloids, soil chemistry and the environment. Adv Exp Med Biol., vol. 679, p. 33-44.

Lou, L.Q., Ye, Z.H., Lin, A.J., Wong, M.H., 2010. Interaction of arsenic and phosphate on their uptake and accumulation in Chinese brake fern. Int J Phytoremediation, vol. 12 (5), p. 487-502.

M

Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.Y., Su, Y.H., McGrath, S.P., Zhao, F.J., 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, vol. 105, p. 9931-9935.

- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E.D., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, vol. 409, p. 579.
- Ma, T.H., Cabrera, G.L., Owens, E., 2005. Genotoxic agents detected by plant bioassays. *Rev Environ Health.*, vol. 20 (1), p. 1-13.
- MacDonald, J.D., Hendershot, W.H., 2006. Modelling trace metal partitioning in forest floors of northern soils near metal smelters. *Environmental Pollution*, vol. 143 (2), p. 228-240.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S., 2007. Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant Science*, vol. 173 (2), p. 96-105.
- Mandal, K.M., Suzuki, K.T., 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta*, vol. 58, p. 201-235.
- Marcato-Romain, C.E., Guiresse, M., Cecchi, M., Cotelle, S., Pinelli, E., 2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere*, vol. 77, p. 345-350.
- Markert, B., 1996. Instrumental Element and Multi-Element Analysis of Plant Samples: Methods and Applications, Wiley, Chichester.
- Martin-Garin, A., Simon, O., 2004. Fiche radionucléide - Cadmium 109 et environnement. IRSN, 14 p.
- Mascher, R., Lippman, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*, vol. 163, p. 961-969.
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Stylbo, M., Thomas, D.J., Kligerman, A.D., 2000. Methylated Trivalent Arsenic Species Are Genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 14 (4), p. 355-361.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., 2008. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research*, vol. 66 (4), p. 459-465.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Redondo-Gómez, S., 2011. Comparison of germination, growth, photosynthetic responses and metal uptake between three populations of *Spartina densiflora* under different soil pollution conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74 (7), p. 2040-2049.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Redondo-Gómez, S., 2012. Tolerance to and accumulation of arsenic in the cordgrass *Spartina densiflora* Brongn. *Bioresource Technology*, vol. 104, p. 187-194.
- Matera, V., 2001, Etude de la mobilité et de la spéciation de l'arsenic dans les sols de sites industriels pollués : estimation du risque induit. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, 288 p.

Mathieu, C., Pieltain, F., Asseline, J., Chossat, J. C., Valentin, C., 1998. Analyse physique des sols - méthodes choisies. Lavoisier. 275 p.

Matschullat, J., 2000. Arsenic in the geosphere - A review. Sci. Total Environ., vol. 249, p. 297-312.

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence -a practical guide. Journal of Exp. Bot., vol. 51 (345), p. 659-668.

McArthur, J.M., Banerjee, D.M., Hudson-Edwards, KA, Mishra, R., Purohit, R., Ravenscroft, P., Cronin, A., Howarth, R.J., Chatterjee, A., Talukder, T., Lowry, D., Houghton, S., Chadha, D.K., 2004. Natural organic matter in sedimentary basins and its relation to arsenic in anoxic ground water: the example of West Bengal and its worldwide implications. Appl. Geochem., vol. 19, p. 1255-1293.

Mc Bride, M.B., Richards, B., Steenhuis, T., Russo, J., Sauvé, S., 1997. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. Soil Science, vol. 162 (7), p. 487-500.

McGowen, S.L., Basta, N.T., and Brown, G.O., 2001. Use of diammonium phosphate to reduce heavy metal solubility and transport in smelter-contaminated soils. Journal of Environmental Quality, vol. 30, p. 493-500.

McGrath, S.P., 1998. Phytoextraction for soil remediation. Plants that hyperaccumulate heavy metals. R.R. Brooks. Wallingford, CAB International, p. 261-287.

McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analysis, vol. 31 (11-14), p. 1661-1700.

Meddour, R., 2011. La méthode phytosociologique sigmatiste. Université des Sciences Biologiques et Agronomiques de Tizi Ouzou, Algérie, 40 p.

MEDDTL, 2007. La démarche d'Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM). Sites et sols pollués, 42 p.

Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M., Lesage, E., Tack, F.M.G., 2005. Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. Chemosphere, vol. 61 (4), p. 561-572.

Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1990. An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus*. New Phytologist, vol. 16, p. 29-35.

Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. Journal of Experimental Botany, vol. 43, p. 519-524.

Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. New Phytologist, vol. 154, p. 29-43.

Mench, M., Vangronsveld, J., Lepp, N., Edwards, R., 1998. Physico-chemical aspects and efficiency of trace element immobilization by soil amendments. In : *In situ* inactivation and phytoremediation of metal contaminated soils. Vangronsveld J. and Cunningham S. (eds.). Springer-Verlag, p. 151-182.

Mench, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Lepp, N.W., Edwards, R., 2000. *In situ* metal immobilisation and phytostabilisation of contaminated soils. In *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Eds. N Terry and G Bañuelos. Lewis Publishers, Boca Raton, FL., p. 323-358.

Mench, M., Bussiere, S., Boisson, J., Castaing, E., Vangronsveld, J., Ruttens, A., De Koe, T., Bleeker, P., Assuncao, A., Manceau, A., 2003. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after *in situ* treatment. *Plant and Soil*, vol. 249, p. 187-202.

Mench, M., Baize, D., 2004. Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces mesures pour réduire l'exposition. *Courrier de l'environnement de l'INRA* n°52, p.31-56.

Mench, M., Vangronsveld, J., Lepp, N., Bleeker, P., Ruttens, A., Geebelen, W., 2005. Phytostabilisation of metal - contaminated sites. in T. N. Springer Editor *Phytoremediation of metal - contaminated soils*, Echevarria, G., Morel, J. L., Goncharova, N. (Eds), Trest, Czech Republic, p. 109-190.

Mench, M., Vangronsveld, J., Beckx, C., Ruttens, A., 2006. Progress in assisted natural remediation of an arsenic contaminated agricultural soil. *Environmental Pollution*, vol. 144 (1), p. 51-61.

Mench, M., Vangronsveld, J., Lepp, N., Ruttens, A., Bleeker, P., Geebelen, W., 2007. Use of soil amendments to attenuate trace element exposure: sustainability, side effects and failures. in R. H. M. McLaughlin, editor. *Natural attenuation of trace element availability in soils*. SETAC Publications, Floride, p. 197-223.

Mench, M., Bert, V., Schwitzguebel, J.P., Lepp, N., Schröder, P., Gawronski, S., Vangronsveld, J., 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: Outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal Soils Sediments*, vol. 10, p. 1039-1070.

Mendoza-Cózatl, D.G., Jobe, T.O., Hauser, F., Schroeder, J.I., 2010. Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 12 (3), p. 364-372.

Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 121-130.

Mermet, J.M., Cosnier, A., Vélasquez, S., Lebouil, S., 2007. L'analyse multi-raies en spectrométrie ICP-AES pour une utilisation efficace de l'information spectrale. *Spectra Analyse*, vol. 258, 3 p.

Milivojevic, D.B., Nikolic, B.R., Drinic, G., 2006. Effects of arsenic on phosphorus content in different organs and chlorophyll fluorescence in primary leaves of soybean. *Biologia Plantarum*, vol. 50 (1), p. 149-151.

Miquel, G., 2001. Rapport d'information n° 261. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques. Tech., 344 p.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, vol. 9, p. 490-498.

Mleczek, M., Rutkowski, P., Rissmann, I., Kaczmarek, Z., Golinski, P., Szentner, K., Strażyńska, K., Stachowiak, A., 2010. Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass and Bioenergy*, vol. 34 (9), p. 1410-1418.

Mohapatra, D., Mishra, D., Chaudhury, G.R., Das, R.P., 2008. Removal of arsenic from arsenic rich sludge by volatilization using anaerobic microorganisms treated with cow dung. *Soil Sediment Contam. Int. J.*, vol. 17, p. 301-311.

Morel, J.L., 2010. Stratégies de remédiation *in-situ* des sols pollués - la phytoremédiation. GISFI, Communication Académie Lorraine des Sciences, 42 p.

Moreno-Jimenez, E., Esteban, E., Fresno, T., Lopez de Egea, C., Penalosa, J.M., 2010. Hydroponics as a valid tool to assess arsenic availability in mine soils. *Chemosphere*, vol. 79, p. 513-517.

Moreno-Gimenez, E., Esteban, E., Carpena-Ruiz, R.O., Penalosa, J.M., 2012. Arsenic and mercury induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, sous-presse.

Morin, G., Lecocq, D., Juillot, F., Calas, G., Ildefonse, P., Belin, S., Briois, V., Dillmann, P., Chevallier, P., Gauthier, C., Sole, A., Petit, P.E., Borensztajn, S., 2002. EXAFS evidence for sorbed arsenic(V) and pharmacosiderite in a soil overlying the Echassieres geochemical anomaly, Allier, France. *Bull. Soc. Géol. Fr.*, vol. 173, p. 281-291.

Mossmann, J.R., 2000. Site de la Vieille Usine à Auzon. Rapport de synthèse des travaux de caractérisation de l'état du site. Recommandations en vue de la réhabilitation du site. Rapport BRGM R40910, 66 p.

Moszkowicz, P., 2002. Caractérisation de la mobilisation de polluants inorganiques présents dans les sols pollués - 2ème phase. Etude N° 00-0505/2A - LAEPSI (INSA de Lyon), RE.CO.R.D., 63 p.

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1767 (6), p. 414-421.

Muschitz, A., 2009. Réponses physiologiques de végétaux supérieurs aux stress métalliques. Caractérisation du rôle des parois cellulaires dans les stratégies défensives des cellules de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) face aux éléments traces métalliques. Thèse de l'Université d'Artois, 234 p.

Mylona, P.V., Polidoros, A.N., Scandalios, J.G., 1998. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 25 (4-5), p. 576-585.

Myöhänen, T., Mäntylähti, V., Koivunen, K., Matilainen, R., 2002. Simultaneous determination of As, Cd, Cr and Pb in aqua regia digests of soils and sediments using electrothermal atomic absorption spectrometry and fast furnace programs. *Spectrochimica Acta Part B*, vol. 57, p. 1681-1688.

N

NEN 5704, 1996. Soil - Sample preparation of soil - Extraction with a calcium chloride solution (0.01 mol/L). 4p.

Nicholas, D.R., Ramamoorthy, S., Palace, V., Spring, S., Moore, J.N., Rosenzweig, F., 2003. Biogeochemical transformations of arsenic in circumneutral freshwater sediments. *Biodegradation*, vol. 14, p. 123-137.

O

O'Neill, P., 1995. Arsenic. Dans "Heavy Metals in Soil, Alloway", Ed. Blackie Academic & Professional, p. 105-121.

Onishi, H., 1969. Arsenic. Dans "Handbook of Geochemistry", Wedepohl, K.H. Ed., Heidelberg, p. 33B-33O.

Onken, B.M., Hossner, L.R., 1996. Division S-2 - soil chemistry: determination of arsenic species in soil solution under flooded conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 60, p. 1385-1392.

Öquist, G., Chow, W.S., 1992. On the relationship between the quantum yield of photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and the quantum yield of CO₂-dependent O₂ evolution. *Photosynth. Res.*, vol. 33, p. 51-62.

Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2005. Arsenic, microbes, and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.*, vol. 13, p. 45-49.

Osmond, C.B., Grace, S.C., 1995. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, vol. 46, p. 1351-1362.

Otones, V., Álvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A., Santa Regina, I., Murciego, A., 2011. Arsenic distribution in soils and plants of an arsenic impacted former mining area. *Environ Pollut.*, vol. 159 (10), p. 2637-2647.

P

Pagliano, C., Raviolo, M., Dalla Vecchia, F., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., Rascio, N., Barbato, R., La Rocca, N., 2006. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by

cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology, vol. 84, p. 70-78.

Päivöke, A.E.A, Simola, L.K., 2001. Arsenate Toxicity to *Pisum sativum*: Mineral Nutrients, Chlorophyll Content, and Phytase Activity. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 49, p. 111-121.

Pal, R., Rai. J.P., 2010. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. Appl Biochem Biotechnol., vol. 160 (3), p. 945-63.

Panda, S.K., Upadhyay, R.K., Nath, S., 2010. Arsenic stress in plants. J. Agronomy & Crop Science, vol. 196, p. 161-174.

Parent, C., Capelli, N., Dat, J., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes, C.R. Biologies, vol. 331, p. 255-261.

Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N., Chung, J.W., 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, vol. 185, p. 549-574.

Pauwels, M., 2006. Origine et évolution de la tolérance au zinc chez *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) - Approches phénotypiques et génétiques. Thèse de doctorat soutenue à l'Université de Lille I, 153 p.

Pedro, G., Delmas, A., 1970. Les principes géochimiques de la distribution des éléments traces dans les sols. Annales agronomiques - Numéro spécial: Les oligo-éléments en France, vol. 21, p. 483-518.

Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., Focardi S.E., 2007. Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. Journal of applied microbiology, vol. 103 (6), p. 2299-2308.

Pérez-Cid, B., Lavilla, I., Bendicho, C., 1999. Comparison between conventional and ultrasound accelerated Tessier sequential extraction schemes for metal fractionation in sewage sludge. Journal of Analytical Chemistry, vol. 363 (7), p. 667-672.

Petit, A-N., Fontaine, F., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N., 2008. Photosynthesis limitations of Grapevine after treatment with the Fungicide Fludioxonil. J. Agric. Food Chem., vol. 56, p. 6761-6767.

Picault, N., Cazalé, A.C., Beyly, A., Cuiné, S., Carrier, P., Luu, D.T., Forestier, C., Peltier, G., 2006. Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in *Arabidopsis*; effects on heavy metal tolerance and accumulation. Biochimie, vol. 88 (11), p. 1743-1750.

Pickering, I.J., Prince, R.C., George, M.J., Smith, R.D., George, G.N., Salt, D.E., 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian Mustard. Plant Physiol., vol. 122, p. 1171-1177.

Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology, vol. 56, p. 15-39.

Piquet-Pissaloux, A., Robin, A.K., 2006. Impact of both anthropogenic and naturally arsenic pollution on different plant species. Studied area in Auzon. Poster, ENITA Clermùont Ferrand, 1 p.

Plank, C.O., 1999. Plant Analysis HandBook for Georgia - Nutrient Content of Plant. Agricultural and Environmental Services Laboratories in <http://aesl.ces.uga.edu/publications/plant/Nutrient.htm>

Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. Photosynthesis Research, vol. 73, p. 149-156.

Porter, S.K., Scheckel, K.G., Impellitteri, C.A., Ryan, J.A., 2004. Toxic metals in the environment: thermodynamic considerations for possible immobilisation strategies for Pb, Cd, As, and Hg. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, vol. 34, p. 495-604.

Pourrut, B., 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de l'Université de Toulouse, 297 p.

Pourrut, B., Lopareva-Pohu, A., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Waterlot, C., Bidar, G., Shirali, P., Douay, F., 2011. Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial: Part 2. Influence on plants. Science of The Total Environment, vol. 409 (21), p. 4504-4510.

Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., 1999. Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer Ed., Berlin and New York, 413 p.

Q

Quazi, S., Sarkar, D., Datta, R., 2011. Changes in arsenic fractionation, bioaccessibility and speciation in organo-arsenical pesticide amended soils as a function of soil aging. Chemosphere, vol. 84 (11), p. 1563-1571.

Quemeneur, M., 2008. Les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'arsenic : recherche de bioindicateurs. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, 275 p.

R

Raab, A., Williams, P.N., Meharg, A., Feldmann, J., 2007. Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. Environmental Chemistry, vol. 4, p. 197-203.

Radetski, C.M., Ferrari, B., Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Ferard, J.F., 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. Sci. Total Environ., vol. 333 (1-3), p. 209-216.

Radu, T., Subacz, J.L., Phillippi, J.M., Barnett, M.O., 2005. Effects of dissolved carbonate on arsenic adsorption an mobility. Environ. Sci. Technol., vol. 39, p. 7875-7882.

Rahman, M.A., Hasegawa, H., Rahman, M.M., Islam, M.N., 2007. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere*, vol. 67, p. 1072-1079.

Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, T., Okumura, C., Rahman, M.M., 2007. Arsenic adsorption on iron plaque and uptake in duckweed, (*Spirodela polyrhiza* L.) affected by chemical species. S.K. Starrett, J. Hong, R.J. Wilcock, Q. Li, J.H. Carson, S. Arnold (Eds.), *International Conference on Environmental Science and Technology (ICEST)*, American Science Press, Houston, TX, USA, p. 319-325.

Rahman, M.A., Kadohashi, K., Maki, T., Hasegawa, H., 2011. Transport of DMAA and MMAA into rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 72 (1), p. 41-46.

Rajakaruna, N., 2004. The edaphic factor in the origin of plant species. *International Geology Review*, vol. 46, p. 471-478.

Ramel, F., 2009. Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de l'Université de Renne I / CNRS, 307 p.

Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, vol. 180 (2), p. 169-181.

Raskin, I., Kumar, N.P.B.A., Douchenkov, S. Phytoremediation of metals. United States Patent 5364451, 15 Nov. 1994.

Raskin, I., Smith, R. D., and Salt, D. E., 1997. Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 8, p. 221-226.

Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., Quevauviller, P., 1999. Improvement of the BCR 3-step extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 1, p 57-61.

Rausser, N., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys*, vol. 31 (1), p. 19-48.

Redman, A.D., Macalady, D.L., Ahmann, D. 2002. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, p. 2889-2896.

Reilley, K.A., Banks, M.K., Schwab, A.P., 1996. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rizhosphere. *Journal of Environmental Quality*, vol. 25, p. 212-219.

Remon, E., Bouchardon, J.L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J.C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environ. Pollut.*, vol. 137, p. 316-323.

Remon, E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de l'Université Jean Monnet, 166 p.

Remon, E., Bouchardon, J.C., Joly, J., Cornier, B., Faure, O., 2009. Accumulation et effets des éléments métalliques sur les populations végétales spontanées de trois crassiers métallurgiques : peut-on utiliser les plantes comme bioindicateurs ? *Etude et Gestion des Sols*, vol. 16 (3/4), p. 313-321.

Renella, G., Landi, L., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Pietramellara, G., Mench, M., Nannipieri, P., 2008. Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environmental Pollution*, vol. 152, p. 702-712.

Requejo, R., Tena, M., 2012. Influence of glutathione chemical effectors in the response of maize to arsenic exposure. *Journal of Plant Physiology*, vol. 169 (7), p. 649-656.

Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L., Desnos, T., 2006. Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, vol. 29, p. 115-125.

Ruttens, A., Colpaert, J.V., Mench, M., Boisson, J., Carleer, R., Vangronsveld, J., 2006. Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. II: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on metal leaching. *Environmental Pollution*, vol. 144 (2), p. 533-539.

Ruttens, A., Adriaensen, K., Meers, D., De Vocht, A., Geebelen, W., Carleer, R., Mench, M., Vangronsveld, J., 2010. Long-term sustainability of metal immobilization by soil amendments: Cyclonic ashes versus lime addition. *Environmental Pollution*, vol. 158, p. 1428-1434.

Rzepka, M.A., Cuny, D., 2008. Biosurveillance végétale et fongique des ETM atmosphérique. *Air Pur*, vol. 75, p. 66-79.

S

Sadiq, M., 1997. Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water Air Soil Pollut.*, vol. 93, p. 117-136.

Samantaray, S., Rout, G.R., Das, P., 1998. Differential nickel tolerance of mung bean (*Vigna radiata* L.) genotypes in nutrient culture. *Agronomie*, vol. 18, p. 537-544.

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., Del Rio, L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.*, vol. 52, p. 2115-2126.

Sanders, O.I., Rensing, C., Kuroda, M., Mitra, B., Rosen, B.P., 1997. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, vol. 179, p. 3365-3367.

Sang, N., Li, G., 2004. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag., vol. 560 (2), p. 159-165.

Sanjuan, B., Crouzet, C., Brach, M., 2001. Caractérisation d'une contamination des eaux par l'arsenic : exemples d'Auzon et d'Auzelles (Auvergne) - Etude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 2000-EAU-713. Rapport n° BRGM/RP-50737-FR, 48 p.

Santos, J.A.G., Gonzaga, M.I.S., Ma, L.Q., Srivastava, M., 2008. Timing of phosphate application affects arsenic phytoextraction by *Pteris vittata* L. of different ages. Environmental Pollution, vol. 154 (2), p. 306-311.

Sappin-Didier, V., Vansuyts, G., Mench, M., Briat, J.F., 2005. Cadmium availability at different soil pH to transgenic tobacco overexpressing ferritin. Plant and Soil, vol. 270, p. 189-197.

Sarkar, D., Makris, K.C., Vandanapu, V., Datta, R., 2007. Arsenic immobilization in soils amended with drinking-water treatment residuals. Environ. Poll., vol. 146 (2), p. 414-419.

Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Malkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J.M., Krynski, K., 2004. Phytoextraction crop disposal-an unsolved problem. Environmental Pollution, vol. 128, p. 373-379.

Schat, H., Ten Bookum, W.M., 1992. Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. Heredity, vol. 63, p. 219-229.

Schnoor, J.L., 1997. Phytoremediation, Technology Overview Report. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Series E, Vol. 1, 26 p.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research, vol. 10, p. 51-62.

Schultz, E., Joutti, A., 2007. Arsenic ecotoxicity in soils. Finnish Environment Institute, Espoo, 56 p.

Schurr, U., Walter, A., Rascher, U., 2006. Functional dynamics of plant growth and photosynthesis – from steady-state to dynamics – from homogeneity to heterogeneity, Plant, Cell & Environment, vol. 29 (3), p. 340-352.

Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility for the risk assessment and remediation of soils and sediment is complicated. Environmental Science and Technology, vol. 38, p. 228A-231A.

Shahid, M., 2010. Induction de la phytotoxicité du Plomb chez *Vicia faba* L. : rôles de l'absorption et de la spéciation. Thèse de l'Université de Toulouse-INPT, 301 p.

Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C., 2011. Pb-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. Ecotoxicol Environ Saf, vol. 74, p 78-84.

Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., Singsaas, E.L., 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell & Environment*, vol. 30 (9), p. 1035-1040.

Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, vol. 17 (1), p.35-52.

Sharma, V.K., Sohn, M., 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, vol. 35 (4), p. 743-759.

Shi, G., Cai, Q., 2009. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops *Biotechnology Advances*, vol. 27 (5), p. 555-561.

Shi, G., Liu, C., Cui, M., Ma, Y., Cai, Q., 2011. Cadmium Tolerance and Bioaccumulation of 18 Hemp Accessions. *Appl Biochem Biotechnol.*, vol. 27 (5), p. 555-561.

Shi, W.Y., Shao, H.B., Li, H., Shao, M.A., Du, S., 2009. Co-remediation of the lead-polluted garden soil by exogenous natural zeolite and humic acids. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 167 (1-3), p. 136-140.

Shiralipour, A., Ma, L., Cao, R., 2002. Effects of compost on arsenic leachability in soils and arsenic uptake by a fern. Florida Centre for Solid Hazardous Waste Management, State University System of Florida, Gainesville, Florida. Report 02-04.

Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastavan S., Tripathi, R.D., Tuli, R., 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, p. 1102-1110.

Shu, W.S., Ye, Z.H., Zhang, Z.Q., Lan, C.Y., Wong, M.H., 2005. Natural colonization of plants on five lead/zinc mine tailings in Southern China. *Restoration Ecology*, vol. 13 (1), p. 49-60.

Siedlecka, A., Krupa, Z., 2004. Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions-how many strategies. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 9, p. 56-57.

Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O., 2009. Metallothioneins and Related Chelators. *Met. Ions Life Sci.*, vol. 5, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 514 p.

Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, vol. 17, p. 517-568.

Smith, E., Nadu, R., Alston, A.M., 1998. Arsenic in the soil environment: a review. *Adv Agron*, vol. 64, p. 149-195.

Sobkowiak, R., Deckert, J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 41, p. 767-772.

Song, W.Y., Park, J., Mendoza-Cózatl, D.G., Suter-Grotemeyer, M., Shim, D., Hörtensteiner, S., Geisler, M., Weder, B., Rea, P.A., Rentsch, D., Schroeder, J.I., Lee, Y., Martinoia, E., 2010. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 107, p. 21187-21192.

Sougir, D., Ferjani, E., Ledoigt, G., Goupil, P., 2008. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma*, vol. 233 (3-4), p. 203-7.

Stracek, O., Bhattacharga, P., Jacks, G., Gustafsson, J.-P., von Brömmssen, M., 2004. Behavior of arsenic and geochemical modelling of arsenic enrichment in aqueous environments. *Applied Geochemistry*, vol. 19 (2), p. 169-180.

Srivastava, M., Ma, L.Q., Singh, N., 2005. Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*, vol.56, p.1335-1342.

Sterckeman, T., Douay, F., Baize, D., Fourrier, H., Proix, N., Schwartz, C., 2007. Référentiel Pédo-Géochimique du Nord-Pas de Calais - Méthode et principaux résultats. *Etude et Gestion des Sols*, vol. 14 (2), p. 153-168.

Stoeva, N., Bineva, T., 2003. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulg. J. Plant Physiol.*, vol. 29 (1-2), p. 87-95.

Stoeva, N., Berova, M., Zlatev, Z., 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum*, vol. 49 (2), p. 293-296.

Stollenwerk, K., 2003. Geochemical processes controlling transport of arsenic in groundwater: A review of adsorption. In Welch A.H. & Stollenwerk K.G. (Eds.), *Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence*. Boston, Kluwer Academic Publishers, p. 67-100.

Stoltz, E., Greger, M., 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 47, p. 271-280.

Su, Y.H., McGrath, S.P., Zhu, Y.G., Zhao, F.J., 2008. Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*, vol. 180 (2), p. 434-441.

Sun, R.L., Zhou, Q.Z., Sun, F.H., Jin, C.X., 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 60, (3), p. 468-476.

Sun, Y., Zhou, Q., Diao, C., 2008. Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology*, vol. 99 (5), p. 1103-1110.

T

Takeno, N., 2005. Atlas of Eh-pH diagrams. Intercomparaison of thermodynamic databases. Geological Survey of Japan Open File Report N° 419, 285 p.

Tamaki, S., Frankenberger, W.T., 1992. Environmental biochemistry of arsenic. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 124, p. 79-110.

Tanaka, R., Tanaka, A., 2007. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Biol., vol. 58, p. 321-346.

Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Van Leewen, H.O., Lobinski, R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. Pure and Applied Chemistry, vol. 72, p. 1453-1470.

Thioulouse, J., Devillers, J., Chessel, D., Auda, Y., 1991. Graphical techniques for multidimensional data analysis. In : Devillers J. and Kercher W. (Eds), Applied Multivariate Analysis in SAR and Environmental Studies. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 153-205.

Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. Chemosphere, vol. 41, p. 219-228.

Tremel-Schaub, A., Feix, I., 2005. Contaminations des sols - Transfert des sols vers la plantes. EDP Sciences, ADEME Ed., Angers, 413 p.

Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J.M., 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. TRENDS in Biotechnology, vol. 25 (4), p.158-165.

Tseng, C., 2004. The potential biological mechanism of arsenic-induced diabetes mellitus. Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 197, p. 67-83.

Tu, S., Ma, L.Q., MacDonald, G.E., Bondada, B., 2004. Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L. Environmental and Experimental Botany, vol. 51 (2), p. 121-131.

U

Ullrich-Eberius, C.I., Sanz, A., Novacky, A.J., 1989. Evaluation of arsenate and vanadate associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba*-G1. Journal of Experimental Botany, vol. 40, p. 119-128.

V

Vaillant, N., 2003. Effet du zinc sur la croissance, l'activité photosynthétique et la synthèse de métabolites secondaires chez différentes espèces de *Datura*. Développement d'un procédé d'épuration des effluents urbains couplé à la production de plantes à intérêt pharmaceutique. Thèse de l'Université d'Auvergne, 163 p.

Vaillant, N., Monnet, F., Sallanon, H., Coudret, A., Hitmi, A., 2004. Use of commercial plant species in a hydroponic system to treat domestic wastewaters. J Environ Qual., vol. 33 (2), p. 695-702.

Van Herwijnen, R., Hutchings, T.R., Al-Tabbaa, A., Moffat, A.J., Johns M.L., and Ouki, S.K., 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts, *Environmental Pollution*, vol. 150, p. 347-354.

Ventura-Lima, J., Bogo, M.R., Monserra, J.M., 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74 (3), p. 211-218.

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 12, p.1-9.

Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., 2007. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere*, vol. 68, p. 1563-1575.

Vernay, P., Austruy, A., Gauthier-Moussard, C., Hitmi A., 2009. Germination et fonctionnement du système photosynthétique des végétaux comme bioindicateurs de pollution des sols, *Étude et Gestion des Sols*, vol. 16 (3/4), p. 349-357.

Vialaron, C., 1998. L'arsenic: son histoire, son usage, son exploitation dans le département de la Haute-Loire. Vialaron Ed., Le Puy en Velay, 127 p.

Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, vol. 153, p. 376-387.

W

Walter, J.M.N., 2006. Méthode d'étude de la végétation. Université Louis Pasteur de Strasbourg, 23 p.

Wang, C.R., Wang, X.R., Tian, Y., Yu, H.X., Gu, X.Y., Du, W.C., Zhou, H., 2008. Oxidative stress, defense response, and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environ Toxicol Chem.*, vol. 27 (4), p. 970-977.

Wang, H.B., Wong, M.H., Lan, C.Y., Baker, A.J.M., Qin, Y.R., Shu, W.S., Chen G.Z., Ye, Z.H., 2007. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China, *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 225-233.

Wang, H.B., Xie, F., Yao, Y.Z., Zhao, B., Xiao, Q.Q., Pan, Y.P., Wang, H.J., 2012. The effects of arsenic and induced-phytoextraction methods on photosynthesis in *Pteris* species with different arsenic-accumulating abilities. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 75, p. 298-306.

Wang, J., Zhao, F.J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., McGrath, S.P., 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol.*, vol. 130, p. 1552-1561.

Wang, S., Mulligan, C.N., 2006. Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. *Journal of hazardous materials*, vol. 138 (3), p. 459-470.

- Wang, S., Mulligan, C.N., 2006. Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, behavior and distribution. *Sci. Total Environ.*, vol. 366, p. 701-721.
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2008. Speciation and surface structure of inorganic arsenic in solid phases: A review. *Environment International*, vol. 34, p.867-879.
- Wang., X., Ma, L.Q., Rathinasabapathi, B., Liu, Y., Zeng, G., 2010. Uptake and translocation of arsenite and arsenate by *Pteris vittata* L.: Effects of silicon, boron and mercury. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 68, p. 222–229.
- Wang, Y.C., Chaung, R.T., Tung, L.C., 2004. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquat. Toxicol.*, vol. 69, p. 67-69.
- Warren, G.P., Alloway, B.J., Lepp, N.W., Singh, B., Bochereau, F.J.M., Penny, C., 2003. Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides. *The Science of the Total Environment*, vol. 311, p. 19-33.
- Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., Adriano, D.C., 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta*, vol. 436 (2), p. 309-323.
- Wertz, J.L., Vanderghem, C., 2011. Etude comparative des applications non énergétiques du chanvre et du miscanthus. ValBiom – Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 18 p.
- Whiting, S.N., Reeves, R.D., Richards, D., Johnson, M.S., Cooke, J.A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J.A.C., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ginocchio, R., Jaffré, T., Johns, R., McIntyre, T., Purvis, O.W., Salt, D.E., Schat, H., Zhao, F.J., Baker, A.J.M., 2004. Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restoration Ecology*, vol. 12, p. 106-116.
- WHO 2001. Arsenic and Arsenic Compounds. 2nd ed. Environmental Health Criteria 224. Geneva: World Health Organization.
- Williford, C.W., Bricka, J., Bricka, R., 2001. Physical separation of metal - contaminated soils. *in* I. K. Iskandar, editor. Environmental restoration of metals - contaminated soils. Lewis publishers, p. 121-166.
- Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, vol. 50, p. 775-780.
- Wu, L., Yi, H., Yi, M., 2010. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 176 (1-3), p. 952-956.
- Wu, Z., Ren, H., McGrath, S.P., Wu, P., Zhao, F.J., 2011. Investigating the Contribution of the Phosphate Transport Pathway to Arsenic Accumulation in Rice, *Plant Physiol.*, vol. 157, p. 498-508.

X

Xenidis, A., Stouraiti, C., Papassiopi, N., 2010. Stabilization of Pb and As in soils by applying combined treatment with phosphates and ferrous iron. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 177 (1-3), p. 929-937.

Xu, W., Kachenko, A.G., Singh, B., 2010. Effect of soil properties on arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* and *Pityrogramma calomelanos* var. *austroamericana*. *Int J Phytoremediation*, vol. 12 (2), p. 174-187.

Y

Yan, Z.Z., Ke, L., Tam, N.F.Y., 2010. Pb stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons. *Aquat Bot*, vol. 92 (2), p. 112-118.

Z

Zhang, H., Xu, W., Guo, J., He, Z., Ma, M., 2005. Coordinated responses of phytochelatin and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science*, vol. 169 (6), p. 1059-1065.

Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L.Q., 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *The Science of the Total Environment*, vol. 300, p. 167-177.

Zhang, W., Cai, Y., Downum, K.R., Ma, L.Q., 2004. Arsenic complexes in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Journal of Chromatography A*, vol. 1043, p. 249-254.

Zhang, W.D., Liu, D.S., Tian, J.C., He, F.L., 2009. Toxicity and accumulation of arsenic in wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties of China. *International Journal of Experimental Botany*, vol. 78, p. 147-154.

Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2002. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist*, vol.156, p. 27-31.

Zhao, F.J., Ma, J.F., Meharg, A.A., McGrath, S.P., 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol*, vol. 181, p. 777-794.

Zhao, F.J., McGrath, S., Meharg, A.A., 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 6, p. 535-559.

Zheng, Y., Wu, J., Ng, J.C., Wang, G., Lian, W., 2002. The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicol Lett*, vol. 133 (1), p. 77-82.

Annexes

Annexe I : Présélection du site atelier

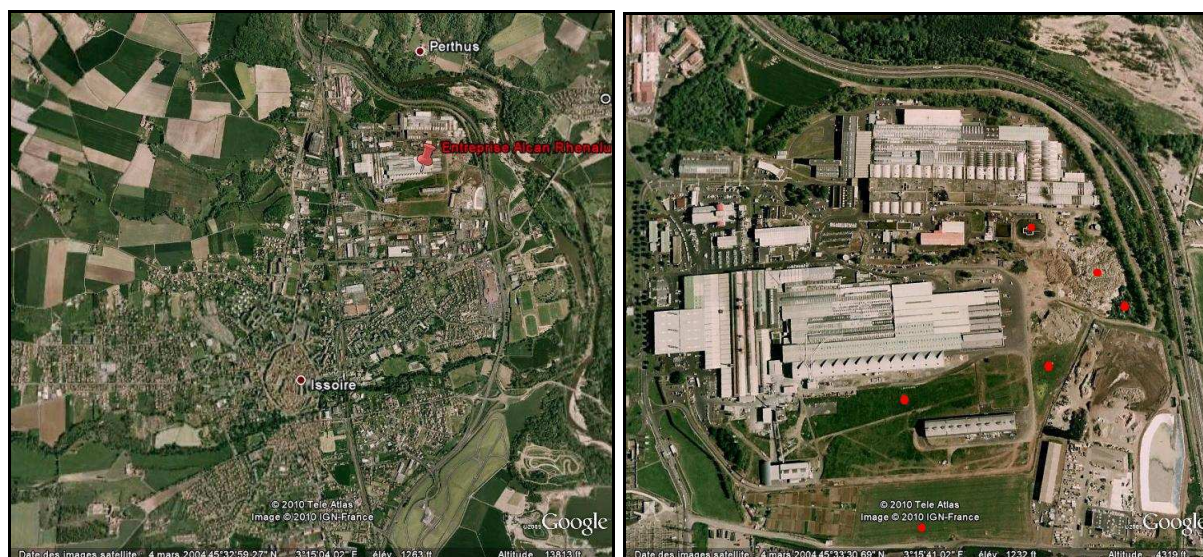
Entreprise Alcan-Péchiney Rhenalu (63)

Situation géographique

France, Auvergne, Puy de Dôme (63), Issoire

Entreprise implantée à proximité de l'A75, au nord-est d'Issoire

Localisation de l'Entreprise Alcan Pechiney Rhenalu à Issoire et détermination des zones de prélèvements, IGN France, 2005



L'entreprise Alcan Pechiney est une entreprise de transformation de l'aluminium et de fabrication de demi-produits en alliages légers. Le site s'étend sur une surface de 90 ha, il est en activité depuis 1984.

Métalloïdes et ETM présents dans le sol

Pas de pollution observé aux éléments traces

Fortes teneurs en Al : $[Al] = 83,6 \text{ g.kg}^{-1}$

Commune de Viviez (12)

Situation géographique

France, Midi-Pyrénées, Aveyron, Viviez

Altitude 202 m

2 zones d'études situées dans la commune de Viviez ont été proposées

Zone 1 : implantée dans la commune, adjacente à l'usine UMICORE (Austruy, 2007)



Zone 2 : prairie à flanc de montagne exposée face à l'usine UMICORE (Austruy, 2007)



- Zone 1 : une friche riveraine de l'usine UMICORE située dans la commune, pollution par transfert et lessivage des sols.
- Zone 2 : une prairie à flanc de montagne située sur le passage des vents dominants, pollution par dépôts atmosphériques principalement.

Métalloïdes et ETM présents	
Zone 1	Zone 2
[Zn] = 15 503 mg.kg ⁻¹	[Zn] = 1349,3 mg.kg ⁻¹
[Pb] = 209,3 mg.kg ⁻¹	
[Cu] = 2 972 mg.kg ⁻¹	[Cu] = 530 mg.kg ⁻¹
As, Cd non déterminés	As, Cd non déterminés

Concession minière d'Enguialès (12)

Situation géographique

France, Midi-Pyrénées, Aveyron (12), Le Fel

Situé à flanc de montagne dans un habitat boisé (pente de 35 °C),

Altitude 474 m

Localisation géographique de la concession minière d'Enguialès, (IGN France, 2005)



**Concession minière
d'Enguiales,
terrassement du site
pour limiter l'érosion
et le lessivage du sol,
(Austruy, 2007)**



L'exploitation est réalisée par la société Minière et Métallurgique du Châtelet à partir de 1962. L'extraction du tungstène débute en 1969 jusqu'en 1979.

La composition des sols indique une forte proportion en wolframite ((Fe, Mn)WO₄), pyrite (FeS₂) et arsénopyrite (FeAsS). Les stériles sont constitués de trois types de matériaux, les déblais, le sable et les boues de granulométrie fine. Enfin, la destruction végétale engendrée par l'activité du site a conduit à la mise à nu des sols et la revégétalisation spontanée a été faible jusqu'à aujourd'hui.

Métalloïdes et ETM présents :

[As] = 1145,3 mg.kg⁻¹

[Cu] = 946,3 mg.kg⁻¹

Site industriel de la Vieille Usine d'Auzon

Situation géographique

Région Auvergne

Département Haute Loire

Plaine alluviale de l'Allier, dans une zone agricole, à proximité du village Auzon

Altitude: 456 m

Situation géographique de Auzon, Haute Loire, France, (à droite, image IGN France, 2005), Site de la “Vieille Usine” d'Auzon, parcelle 227 d'une surface de 4 500 m² environ. Combinaison de 2 paysages, prairial et boisé (à gauche, Austruy, 2008)



Exploitation par la Compagnie Minière Métallurgique, fabrication de pesticides à partir du minerai arsenic. Période d'activité de 1903 à 1949, stockage de pesticides jusqu'en 1969.

Le socle est constitué de gneiss. Le sol est formé d'alluvions argileux de l'Allier et de l'Auzon surmontés par les résidus arséniés de l'exploitation. Le ruisseau Auzon traverse le site, la nappe phréatique sous-jacente est peu exploitée, usage agricole essentiellement.

Métalloïdes et ETM présents

[As] = 3163,8 mg.kg⁻¹

[Pb] = 910,1 mg.kg⁻¹

[Sb] = 797,2 mg.kg⁻¹

[Cu] = 248 mg.kg⁻¹

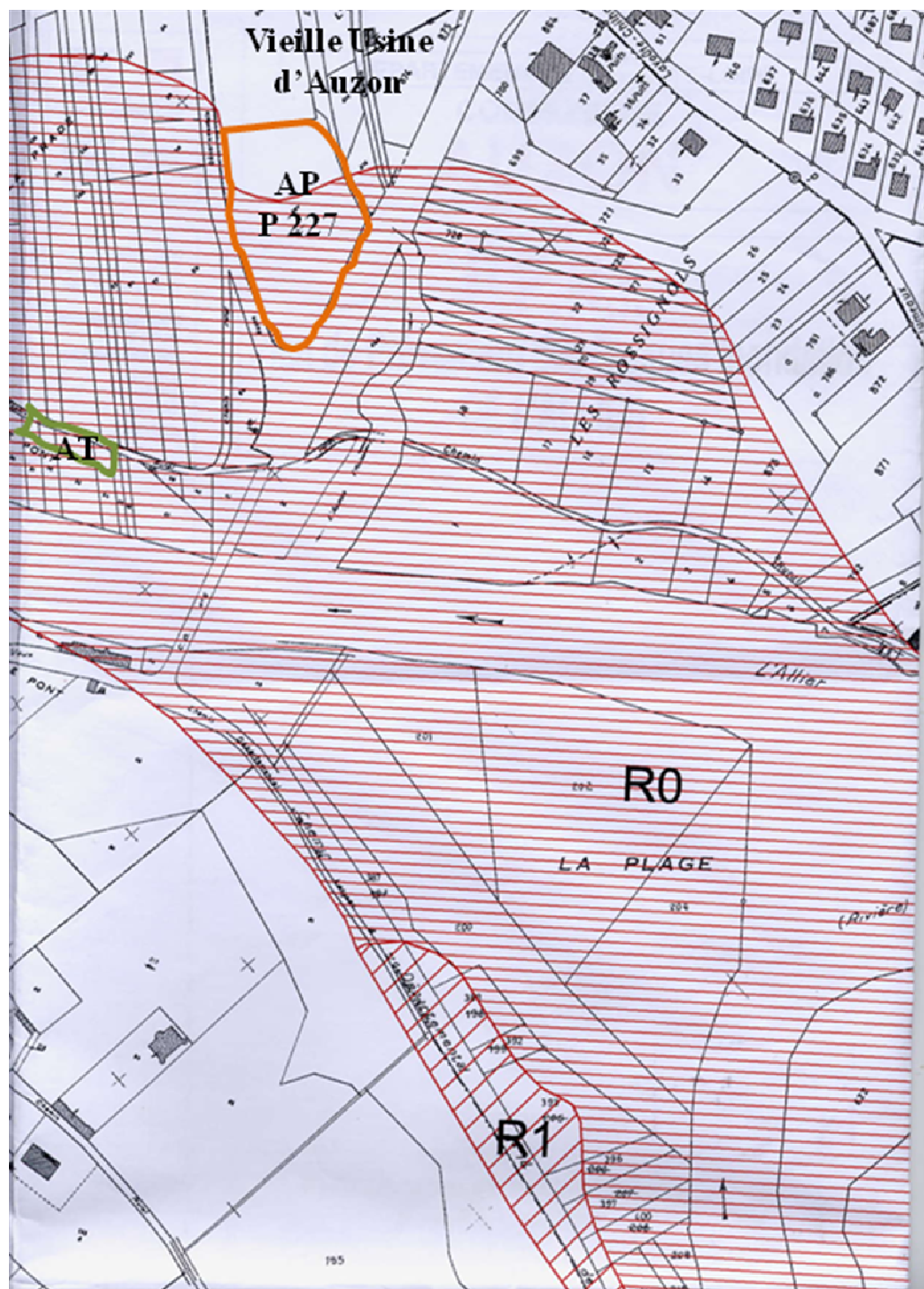
Situation géographique des 4 sites sélectionnés pour l'étude (IGN France, 2012)



Principaux paramètres pris en compte pour la sélection du site atelier

	<i>Zone géographique</i>	<i>Type de pollution</i>	<i>Qualité agronomique du sol</i>	<i>Accessibilité</i>	<i>Autorisation administrative</i>
Auzon (43)	Massif Central Haute Loire	As, Pb, Sb, Cd, Cu	Bonne	Parcelle plane clôturée	Oui
Viviez Zone 1 (12)	Massif Central Aveyron	As, Cd, Zn, Pb, Cu	Moyenne	Parcelle plane, non clôturée, difficile d'accès	Oui
Viviez Zone 2 (12)	Massif Central Aveyron	As, Cd, Zn, Cu	Moyenne	Parcelle en pente, clôturée, difficile d'accès	Oui
Enguialès (12)	Massif Central Aveyron	As, Cu	Faible	Parcelle en pente non clôturée	Non
Alcan Pechiney Rhenalu (63)	Massif Central Puy de Dôme	-	Bonne	Parcelle plane clôturée	Oui

Annexe II : Extrait du PPRI Allier



Annexe III : Protocole pour la solution nutritive d'Hoagland (Gamborg et Wetter, 1975)

Solution A: Solution de microéléments

- 2,8 g H_3BO_3
- 3,4 g $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$
- 100 mg $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$
- 220 mg $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
- 100 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$

Ajuster le volume à 1 L avec de l'eau distillée

Stocker à 4 °C.

Solution B

- 1 mL d' H_2SO_4 concentré

Ajuster le volume à 200 mL avec de l'eau distillée.

Stocker à 4 °C.

Solution C

- 7,44 g $\text{Na}_2\text{EDTA}, 2\text{H}_2\text{O}$
- 10,20 g $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 278)

Compléter le volume à environ 800 mL.

Chauffer la solution à 70 °C à l'abri de la lumière, jusqu'à obtention d'une couleur marron-jaune.

Laisser refroidir, et ajuster le volume à 1 L avec de l'eau distillée.

Stocker à 4 °C.

Solution mère d'Hoagland (10x)

- 9,4 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$
- 5,2 g $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
- 6,6 g KNO_3
- 1,2 g KH_2PO_4
- 10 mL solution A
- 1 mL solution B

Ajuster le volume à 1L avec de l'eau distillée .

Stocker à 4 °C.

Solution fille d'Hoagland (1x)

- 100 mL de solution mère (10x)
- 5 mL solution C

Ajuster le volume à 1000 mL avec de l'eau distillée.

Préparer cette solution extemporanément.

Annexe IV : Dossier chanvre

Organisation et réglementation de la culture du Chanvre

LA CULTURE DU CHANVRE SOUS CONTRAT DE PRODUCTION, AUTORISEE AVEC DES VARIETES CERTIFIEES « NON DROGUE », EST SOUMISE A DECLARATIONS OFFICIELLES.

Le chanvre, plante à fibres cultivée en Europe à des fins industrielles pour la fabrication de papiers spéciaux, ainsi que pour des produits non tissés et le textile, donne également lieu à la commercialisation de produits annexes à partir du bois de la tige : panneaux de particules pour l'ameublement, litières pour animaux, aliments de lest cellulosique, isolation et construction. La graine (chènevis) est utilisée en l'état ou triturée pour la pêche et l'alimentation des animaux de cages, des pigeons et certains gibiers.

Dans le cas général, la culture se fait dans le cadre de la Politique Agricole Commune par inscription au dossier PAC individuel de l'agriculteur (Organisation Commune de Marché « fibre », jachère industrielle ou activation simple du Droit à Paiement Unique). Consultez votre Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt).

Dans certains cas particulier, la culture peut se faire « hors PAC », à la condition de faire parvenir au CEAPC une déclaration sur l'honneur de positionnement géographique qui sera communiqué aux administrations (Ministère de l'intérieur ...).

En effet, ce chanvre à fibres appartient à l'espèce **Cannabis sativa**, tout comme le chanvre à drogue dont il diffère par des caractéristiques morphologiques, mais surtout par sa teneur en un composé psychotrope spécifique : le **THC (Tétrahydrocannabinol)**. Le chanvre industriel, bien que dépourvu de propriétés stupéfiantes, est soumis à une réglementation très stricte.

REGLEMENTATION GENERALE : LA PRODUCTION, LA VENTE ET L'EMPLOI DU CHANVRE NON HOMOLOGUE SONT INTERDITS.

MINISTERE DE LA SOLIDARITE, DE LA SANTE ET DE LA PROTECTION SOCIALE
Décret N° 88-1231 du 29/12/88 relatif à certaines substances et préparations dangereuses –
JO du 31/12/88 - page 16815. Article R 5181 page 16822.

Sont interdits la production, la mise en marché, l'emploi et l'usage :

- 1° - du Cannabis, de sa plante et de sa résine, des préparations qui en contiennent ou de celles qui sont obtenues à partir du Cannabis, de sa plante ou de sa résine ;
- 2° - des Tétrahydrocannabinols, de leurs esters, éthers, sels, ainsi que des sels des dérivés précités et de leurs préparations.

Des dérogations aux dispositions énoncées ci-dessus peuvent être accordées par le Ministre de la Santé, aux fins de recherche, de contrôle ou de fabrication de dérivés autorisés.

Cependant, le Ministre chargé de la Santé, le Ministre chargé de l'Agriculture et le Ministre chargé de l'Industrie peuvent, par arrêté conjoint, autoriser la culture, l'importation et l'exportation de variétés de Cannabis dépourvues de propriétés stupéifiantes.

REGLEMENTATION PARTICULIERE : DANS CERTAINES CONDITIONS, LA CULTURE DU CHANVRE A FIBRES EST AUTORISEE.

MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SOLIDARITE

Arrêté du 22/08/90 portant application de l'article R.5181 pour le Cannabis – JO du 04/10/90 page 12041, modifié par l'arrêté du 27 Mai 1997 - JO du 31/05/97, modifié par l'arrêté du 2 juillet 1999 – JO du 8 Juillet 1999.

Le Ministre de la Solidarité, de la Santé et de la Protection Sociale, le Ministre de l'Agriculture et de la Forêt, le Ministre de l'Industrie et de l'Aménagement du territoire ;
Vu le code de la Santé Publique, notamment les articles L.627 et R.5181 ;
Vu le règlement CE N° 1172/2000 de la Commission ;

arrêtent :

Article 1

Sont autorisées au sens de l'article R.5181 du code susvisé, la culture, l'importation, l'exportation, l'utilisation industrielle et commerciale (fibres et graines) des variétés de Cannabis sativa répondant aux critères suivants :

- le poids de THC (Tétrahydrocannabinol) de ces variétés, par rapport au poids d'un échantillon porté à poids constant, n'est pas supérieur à 0,20 %.
- la détermination du taux de tétrahydrocannabinol et de la prise d'échantillons en vue de cette détermination sont effectuées selon la méthode unique prévue en annexe 1.

Article 2

Les variétés autorisées sont les suivantes :

* Carmagnola	* C.S.	* Delta-Llosa	* Delta-405	*Santhica 70
* Fédora 17	* Fédrina 74	* Félina 32	* Férimon	
* Fédora 19	* Fibrimon 24	* Félina 34	* Futura	
* Fibranova	* Santhica 23	* Fibrimon 56	* Futura 75	
* Epsilon 68	* Dioïca 88	* Santhica 27	* Uso 31	

Article 3

Le Directeur de la Pharmacie et du Médicament au Ministère de la Solidarité, de la Santé et de la Protection Sociale, le Directeur Général de l'Alimentation au Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, et le Directeur Général de l'Industrie au Ministère de l'Industrie et de l'Aménagement du territoire sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal Officiel de la République Française.

Pour tous renseignements et précisions complémentaires, s'adresser au :

**COMITE ECONOMIQUE AGRICOLE DE LA PRODUCTION DU CHANVRE
20 rue Paul Ligneul – 72000 LE MANS**

Demande relative à la culture du Chanvre dans le cadre d'activité de recherche adressée à la Préfecture du Cantal et de Haute Loire, à la Gendarmerie de Ste Florine (43) et d'Aurillac et à la Mairie d'Auzon.

Madame, Monsieur,

Je vous adresse ce courrier pour vous signaler la mise en place de culture de Chanvre, *Cannabis sativa*, variété Fedora 17, dans les locaux de l'IUT Clermont Ferrand - antenne d'Aurillac et sur une ancienne friche industrielle située sur la commune d'Auzon en Haute Loire.

Ces cultures s'effectuent dans le cadre d'activité de recherche sur le transfert des polluants métalliques entre le sol et la plante et l'utilisation d'espèces végétales dans un processus biologique de réhabilitation de sols industriels fortement pollués. Ce travail est réalisé dans le cadre de ma thèse financée par la Région Auvergne et coencadrée par Mr Hitmi, enseignant chercheur à l'IUT d'Aurillac et responsable du LBPV, et Mr Ledoigt du laboratoire PIAF-ERTAC, professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand.

Cette culture est effectuée de octobre 2009 à mars 2010, dans des phytotrons, chambres de culture où les paramètres (température, photopériode, intensité lumineuse et humidité) sont contrôlés. L'accès à ces pièces est réglementé et réservé aux seuls membres du laboratoire, Mr Hitmi, Mme Moussard, Mr Vernay, les stagiaires Li Si, Sicard Quentin et Chaudière Arthur, ainsi que moi-même.

Cette étude sera suivie d'une expérimentation *in-situ*, effectuée de mai à octobre 2010, sur une friche industrielle polluée située en Haute Loire sur la commune d'Auzon. Ce terrain correspond à la parcelle 227 section AD du plan cadastral de la commune d'Auzon (planche AC, DGI, 2006). La culture s'étend sur une surface totale de 100 m² (10 * 10 m²). Cette expérimentation est réalisée en accord avec Mr le Maire d'Auzon et Mr le Préfet de Haute-Loire d'après la convention signée par les trois parties en janvier 2008. L'accès à la parcelle nécessite une autorisation et un contrôle de la part de la mairie d'Auzon, seuls les membres du laboratoire, Mr Hitmi, Mme Moussard, Mr Vernay, les stagiaires Li Si, Sicard Quentin et Chaudière Arthur, ainsi que moi-même y avons accès.

Vous trouverez ci-joint une note relative à la culture du chanvre en France, la déclaration CEAPC de notre laboratoire ainsi qu'une copie de la convention concernant l'utilisation de ce site pollué comme terrain d'expérimentation pour notre laboratoire.

Restant à votre disposition pour tout renseignement complémentaire, je vous prie d'accepter, Madame, Monsieur, mes sincères salutations.

Comité Economique Agricole de la Production du Chanvre

Association déclarée loi du 1^{er} Juillet 1901
309 685 170

NII : FR95

DECLARATION AU CEAPC

DEVIS N° 2

RECOLTE 2010

A RETOURNER A LA CCPSC AVEC VOTRE REGLEMENT

Nom – Prénom Austruy Annabelle.....

Adresse IUT Clermont Ferrand
Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétale
100 rue de l'Egalité 15000 Aurillac cedex

N° Tél : 0471455755 N° Portable : 0687015187

Votre n° TVA Intracommunautaire : FR _ _ _ _ _

POSSEDEZ-VOUS UN NUMERO D'IDENTIFICATION AGRICOLE (PACAGE)

si oui lequel : _ _ _ _ _

SI OUI

envisagez-vous la culture dans le cadre de l'inscription au dossier PAC (activation du Droit à Paiement Unique)

OUI ☐

NON ☐

IMPERATIF : IDENTIFICATION PARCELLAIRE

LIEUX DE CULTURE

CP & COMMUNE	IDENTIFICATION CADASTRALE DES PARCELLES	SUPERFICIE CHANVRE
Auzon 43 390	Parcelle 227 section AD, plan cadastral Auzon	100 m²

.....
.....
.....
.....

Superficie totale cultivée en chanvre 100 m²

UTILISATION

Travaux de recherche, culture *in-situ* sur sol contaminé à l'As

REMARQUES PARTICULIERES

Site clôturé, non accessible sans autorisation du Préfet et de la Mairie d'Auzon

Fait à Aurillac

le 10/06/2010

Signature

Déclaration de vol de culture de chanvre, C. sativa Fedora 17, Gendarmerie Nationale de Ste Florine, le 31/08/2010

Monsieur,

Les travaux menés par le Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales dans le cadre de mon doctorat sur le site de la Vieille Usine d'Auzon ont aboutit à la mise en place de deux types de culture sur la parcelle 227 depuis le 02-06-10 ainsi que l'installation de 2 parcelles témoins situées au bord de l'Allier sur les terres de Mr Cornaire. Il s'agit d'une culture de *C. sativa* variété Fédora 17 et d'une culture prairiale, réparties sur 26 parcelles de 10 m². La culture de chanvre a été déclarée à l'Institut Technique du Chanvre ainsi qu'à la gendarmerie de Ste Florine et d'Aurillac, à la mairie d'Auzon et d'Aurillac et à la préfecture d'Aurillac. Celles-ci devaient être récoltées le 30 et 31 août 2010.

Le jeudi 26 août 2010, j'ai constaté la dégradation de nos parcelles de culture, matérialisée par l'arrachage de l'ensemble des pieds de chanvre (*C. sativa*). Cela représente 9 parcelles de 10 m² situées sur le site pollué et une parcelle témoin de 10 m² proche de l'Allier. La dégradation a eu lieu entre le mardi 17 août 2010 (date de ma dernière visite) et le jeudi 26 août 2010. Notre laboratoire a décidé de porter plainte au nom de l'Université d'Auvergne pour travaux de recherche saccagés. Je serais jeudi 2 septembre 2010 à Auzon, je profiterai de cette occasion pour venir déposer plainte.

Au delà de la perte matériel et de l'impact sur mes travaux de thèse, la question de la toxicité du produit, cultivé sur des terres contaminées en métaux (essentiellement arsenic, plomb, cadmium, antimoine), pourrait éventuellement se poser. Nos analyses étant réalisées par un laboratoire du Canada, les résultats sur un éventuel transfert ne seront pas disponibles avant un mois.

Je reste à votre disposition pour tout renseignement complémentaire. Veuillez accepter, Monsieur, mes sincères salutations.

Annabelle AUSTRUY

GENDARMERIE NATIONALE

Groupement du PUY EN VELAY

Compagnie de BRIOUDE
COB de STE FLORINE**ENQUÊTE PRÉLIMINAIRE****PROCÈS-VERBAL DE VOL****AUDITION DE VICTIME**

Code Unité	P.V	Année	Nmr Dossier Justice
03165	00753	2010	

N° pièce	N° feuillet
	1/2

Analyse et références

NATINF

Fait **VOL**

Période du 17/08/2010 à 08:00 au 26/08/2010 à 20:00 Code Postal, Commune AUZON 43390 (France)

Adresse de commission du fait Vieille usine

Insee 43016

7151

Nature lieu **AUZON**

Prévu ART.311-1, ART.311-3 C.PENAL.

Réprimé ART.311-3, ART.311-14 1°,2°,3°,4°,6° C.PENAL.

Le jeudi 2 septembre 2010 à 14 heures 15 minutes

Nous soussigné Adjudant RONDEL Louis, Officier de Police Judiciaire en résidence à STE FLORINE -43-

Vu les articles 16 à 19 et 75 à 78 du Code de Procédure Pénale

Nous trouvant au bureau de notre unité à STE FLORINE 43250, rapportons les opérations suivantes :

IDENTITÉ DE LA VICTIME

Nom	Prénom	Date Naissance	Commune Naissance et Code Postal	Insee
AUSTRUY	Annabelle	30/04/1983	TOULOUSE 31000 (France)	31555
Sexe	Situation de Famille		Validité état-civil	
F	Célibataire		Identité confirmée	
Adresse			Profession	Nationalité (si étranger)
7 RUE Nicolas RUBIO LIEU DIT VIELLE			Etudiante	Française
Commune et Code postal	Insee	N° de Téléphone		
YTRAC 15130 (France)	15267	06.87.01.51.87		

Entendons la personne dénommée ci-dessus qui nous déclare en tant que : PRÉPOSÉ DU PROPRIÉTAIRE du ou des biens appartenant à

Forme juridique	Sigle	Raison sociale	Commune/CP	Code INSEE commune
EI	U.D.A		CLERMONT FERRAND 63000	63113
Adresse			SIREN / SIRET	Pays
49 BOULEVARD FRANCOIS MITTERRAND				France
Secteur d'activité				
Université d' AUVERGNE Laboratoire de physiologie et de biotechnologie végétale				

DATE OU PERIODE ET LIEU DES FAITS

Période du 17/08/2010 à 08 heures 00 au 26/08/2010 à 20 heures 00 , Vieille usine à AUZON 43390 (France)

CONSTATATIONS (renseignements utiles, manière d'opérer)

Les plantations ont été arrachées en totalité. Des panneaux indiquant la nature des végétaux (chanvre industrielle) ont été apposés par la plaignante,
La dangerosité des terrains en raison de leur pollution en ARSENIC / PLOMB / ANTIMOINE / CADMIUM n'a pas été affichée sur le terrain.

La personne entendue

L'enquêteur

(DESTINATAIRES)

Date de clôture

Vu et transmis par :

[2] - M. le Procureur de la République à LE PUY EN VELAY

Signature(s)

Le

[-] -

[-] -

[-] -

[1] -

Archives : COB STE FLORINE

Annexe V : Relevé floristique des différentes parcelles expérimentales pour le procédé de phytostabilisation sur la friche industrielle de la "Vieille Usine" d'Auzon réalisé dans la semaine du 30/08/2010 au 03/09/2010.

3 relevés par parcelle expérimentale de 9 m² ont été effectués sur des surfaces de 1 m² sélectionnées aléatoirement.

L'échelle des coefficients d'abondance-dominance (A) de Braun-Blanquet est définie comme suit.

Coef recouvrement	Valeurs
0 (+)	1 -3 ind
1	< 5 %
2	5 % - 25 %
3	25 % - 50 %
4	50 % - 75 %
5	> 75 %

Les coefficients d'abondance dominance sont déterminés visuellement.

Les espèces soulignées en vert sont des espèces appartenant à l'association végétale introduite.

Parcelle témoin végétation naturelle (AT VN)

AT VN						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. retroflexus</i>	Amaranthe réfléchie	Amaranthaceae	3	3	1	2,33
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	0	-	-	0,00
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflée	Caryophyllaceae	1	-	1	0,67
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	1	1	1,00
<i>M. sylvestris</i>	Grande mauve	Malvaceae	-	-	0	0,00
<i>E. repens</i>	Chiendent officinal	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>R. fruticosus</i>	Ronce sauvage	Rosaceae	2	2	3	2,33
Nbre esp /m²			6	4	6	5,33

Parcelle témoin association végétale introduite

AT AV						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	1	1	0	0,67
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>V. faba</i>	Fèverolle	Fabaceae	0	1	0	0,33
<i>A. millefolium</i>	Achillée millefeuille	Asteraceae	-	1	0	0,33
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	-	0	0,33
<i>E. cyprarissias</i>	Euphorbe petit cyprès	Euphorbiaceae	-	1	-	0,33
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	2	1	1	1,33
<i>A. retroflexus</i>	Amaranthe réfléchie	Amaranthaceae	2	2	2	2,00
<i>L. autumnalis</i>	Léontodon d'automne	Asteraceae	1	-	-	0,33
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	0	0	0	0,00
<i>C. rubrum</i>	Chénopode rouge	Chenopodiaceae	1	-	1	0,67
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	1	1	1,00
<i>T. pratense</i>	Trèfle des prés	Fabaceae	1	0	0	0,33
<i>G. robertianum</i>	L'herbe à robert	Geraniaceae	0	-	0	0,00
<i>M. sylvestris</i>	Grande mauve	Malvaceae	0	-	-	0,00
<i>E. repens</i>	Chiendent officinal	Poaceae	1	1	2	1,33
<i>P. oleracea</i>	Pourpier	Portulacaceae	0	-	-	0,00
<i>R. fruticosus</i>	Ronce sauvage	Rosaceae	1	2	1	1,33
<i>U. dioica</i>	Grande ortie	Urticaceae	-	0	-	0,00
Nbre esp / m²			18	15	16	16,33

Parcelles polluées végétation naturelle - sans apport

AP VN						
P1-2						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	2	2	2	2,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	1	-	0	0,33
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	-	1	2	1,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	2	2	2,00
<i>J. inflexus</i>	Jonc glauque	Juncaceae	1	-	-	0,33
<i>A. stolonifera</i>	Agrostide stolonifère	Poaceae	-	2	0	0,67
Nbre esp / m²			5	5	6	5,33
P2-5						
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	0	0	0	0,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostie commune	Poaceae	3	1	2	2,00
<i>A. millefolium</i>	Achillée millefeuille	Asteraceae	1	3	2	2,00
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	-	0	1	0,33
<i>E. vulgare</i>	Vipérine commune	Boraginaceae	1	-	-	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	1	2	1,67
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	0	-	0	0,00
<i>Q. petrea</i>	Chêne rouvre	Fagaceae	-	0	-	0,00
<i>J. inflexus</i>	Jonc glauque	Juncaceae	1	-	-	0,33
<i>L. repens</i>	Linaire rampante	Scrophulariaceae	-	1	1	0,67
Nbre esp / m²			7	7	7	7,00
P3-6						
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	1	0	-	0,33
<i>A. capillaris</i>	Agrostie commune	Poaceae	1	1	2	1,33
<i>A. millefolium</i>	Achillée millefeuille	Asteraceae	2	2	1	1,67
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	-	-	1	0,33
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit cyprès	Euphorbiaceae	1	1	2	1,33
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	1	-	-	0,33
<i>D. carotta</i>	Carotte sauvage	Apiaceae	0	2	0	0,67
<i>E. vulgare</i>	Vipérine commune	Boraginaceae	-	-	1	0,33
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	0	0	0	0,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	1	1	1,00
<i>K. arvensi</i>	Knotie des champs	Dipsacaceae	1	1	-	0,67
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	-	-	1	0,33
<i>C. scoparius</i>	Genêt à balai	Fabaceae	-	2	-	0,67
<i>A. stolonifera</i>	Agrostide stolonifère	Poaceae	1	-	1	0,67
<i>L. repens</i>	Linaire rampante	Scrophulariaceae	1	1	-	0,67
<i>P. oleraceae</i>	Pourpier	Portulacaceae	1	-	0	0,33
Nbre esp / m²			12	10	11	11,00

Parcelles polluées association végétale introduite - sans apport

AP AV						
P1-5						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	1	-	1	0,67
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>D. glomerata</i>	Dactyle aggloméré	Poaceae	1	-	-	0,33
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	-	1	1	0,67
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	2	1	1	1,33
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	0	1	1	0,67
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	0	1	0,67
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit cyprès	Euphorbiaceae	1	1	-	0,67
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	-	1	-	0,33
<i>L. pyrenaicus</i>	Liondent des pyrénées	Asteraceae	-	-	0	0,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	1	2	1,67
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	2	0	1	1,00
Nbre esp / m²			9	9	9	9,00
P2-2						
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	1	-	-	0,33
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	0	-	-	0,00
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	-	-	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	-	-	0,67
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	2	-	-	0,67
Nbre esp / m²			5	0	0	1,67
P3-8						
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	-	0	-	0,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	-	1	2	1,00
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	0	-	-	0,00
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	0	0	1	0,33
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	-	0	-	0,00
<i>A. millefolium</i>	Achillée millefeuille	Asteraceae	-	0	-	0,00
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	1	1	1,00
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit cyprès	Euphorbiaceae	1	1	0	0,67
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	1	0	0	0,33
<i>D. carotta</i>	Carotte sauvage	Apiaceae	0	-	-	0,00
<i>L. pyrenaicus</i>	Liondent des pyrénées	Asteraceae	-	0	1	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	2	1	1,67
<i>C. rotundifolia</i>	Campanule à feuille ronde	Campanulaceae	0	-	2	0,67
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	0	-	1	0,33
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	0	1	0,67
<i>L. repens</i>	Linaire rampante	Scrophulariaceae	-	1	1	0,67
Nbre esp / m²			11	13	12	12,00

Parcelles polluées association végétale introduite - Apport Fe

AP AV (Fe)						
P1-1						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	3	3	2	2,67
<i>D. glomerata</i>	Dactyle aggloméré	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>M. Lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	0	-	1	0,50
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	1	1	0	0,67
<i>V. faba</i>	Fèverolle	Fabaceae	0	0	-	0,00
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	1	1	1,00
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	0	0	-	0,00
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	1	1	1	1,00
<i>C. arvense</i>	Chardon des champs	Asteraceae	-	0	-	0,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	1	2	1,67
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	0	1	1	0,67
<i>Q. petrea</i>	Chêne rouvre	Fagaceae	0	-	0	0,00
<i>R. acetosola</i>	Rumex petite-oseille	Polygonaceae	0	0	1	0,33
Nbres esp / m²			15	14	13	14,00
P2-4						
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	0	-	1	0,33
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	0	-	-	0,00
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	0	0	1	0,33
<i>V. faba</i>	Fèverolle	Fabaceae	-	0	-	0,00
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	1	1	1,00
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	1	0	-	0,33
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	2	1	2	1,67
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	1	0	-	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	0	1	1,00
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	2	1	1,33
<i>S. arvensis</i>	Laiteron des champs	Asteraceae	0	-	0	0,00
<i>Q. petrea</i>	Chêne rouvre	Fagaceae	-	0	0	0,00
<i>E. amygdaloides</i>	Euphorbe des bois	Euphorbiaceae	-	0	-	0,00
<i>E. repens</i>	Chiendent officinal	Asteraceae	1	-	0	0,33
Nbres esp / m²			12	11	10	11,00

Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	-	-	0	0,00
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	-	-	-	0,00
<i>V. faba</i>	Fèverolle	Fabaceae	0	0	-	0,00
<i>A. millefolium</i>	Achillée millefeuille	Asteraceae	1	1	0	0,67
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	2	1	1	1,33
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	1	1	1	1,00
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	1	1	2	1,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	1	1	1,00
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	-	1	-	0,33
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	1	1	0	0,67
<i>L. repens</i>	Linaire rampante	Scrophulariaceae	1	1	0	0,67
<i>D. carotta</i>	Carotte sauvage	Apiaceae	0	0	0	0,00
<i>C. scoparius</i>	Genêt à balai	Fabaceae	-	0	-	0,00
Nbre esp / m²			11	13	11	11,67

Parcelles polluées association végétale introduite - Apport MO

AP AV (MO)						
P1-3						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	0	0	0	0,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	3	2	3	2,67
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	1	2	2	1,67
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	2	1,33
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	1	-	0	0,33
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	1	0	-	0,33
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	0	0	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	2	1	1,33
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	1	1	1,00
<i>G. robertianum</i>	L'herbe à Robert	Geraniaceae	-	0	0	0,00
Nbre esp / m²			9	9	9	9,00
P2-6						
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	1	1	1	1,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	2	2	-	1,33
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	0	1	0	0,33
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	2	0	1,00
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	1	-	0	0,33
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	-	0	0	0,00
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	1	1	1,00
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit cyprès	Euphorbiaceae	-	-	1	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	2	2	2	2,00
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	1	2	1,33
Nbre esp / m²			8	8	9	8,33
P3-2						
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	-	-	0	0,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	-	1	0,67
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	-	-	0,33
<i>E. repens</i>	Chiendent officinal	Poaceae	0	-	1	0,33
Nbre esp / m²			3	0	3	2,00

Parcelles polluées association végétale introduite - Apport Fe + MO

AP AV (Fe + MO)						
P1-7						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	2	1	1	1,33
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	2	1	2	1,67
<i>H. lanatus</i>	Houlque laineuse	Poaceae	1	0	1	0,67
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	0	0,67
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	1	0	1	0,67
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	0	0	-	0,00
<i>V. faba</i>	Fèverolle	Fabaceae	-	0	0	0,00
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	-	0	1	0,33
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	2	2	1	1,67
<i>A. retroflexus</i>	Amaranthe réfléchie	Amaranthaceae	-	0	-	0,00
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	1	-	0	0,33
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	1	2	1,33
<i>Q. petrea</i>	Chêne rouvre	Fagaceae	0	1	0	0,33
<i>R. fruticosus</i>	Ronce sauvage	Rosaceae	-	-	0	0,00
Nbre esp / m²			10	12	12	11,33
P2-3						
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	-	1	0	0,33
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	0	0	1	0,33
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	-	1	0	0,33
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>O. viciifolia</i>	Sainfoin cultivé	Fabaceae	1	1	-	0,67
<i>V. faba</i>	Fèverolle	Fabaceae	-	0	-	0,00
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	1	0	1	0,67
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	-	0	-	0,00
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	0	2	1	1,00
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	0	2	1	1,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	2	1	1,33
<i>E. amygdaloides</i>	Euphorbe des bois	Euphorbiaceae	0	-	-	0,00
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	1	1	1,00
<i>Q. petrea</i>	Chêne rouvre	Fagaceae	0	-	-	0,00
<i>L. repens</i>	Linaira rampante	Scrophulariaceae	-	1	0	0,33
Nbre esp / m²			10	12	9	10,33

P3-5						
Espèces			Coef abondance-dominance			
Nom latin	Nom français	Famille	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Moy/esp
<i>A. elatius</i>	Avoine élevée	Poaceae	-	-	0	0,00
<i>A. capillaris</i>	Agrostide commune	Poaceae	0	1	0	0,33
<i>L. corniculatus</i>	Lotier corniculé	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>M. lupulina</i>	Luzerne lupuline	Fabaceae	-	1	1	0,67
<i>A. millefolium</i>	Achillée millefeuille	Asteraceae	0	1	-	0,33
<i>S. latifolia</i>	Compagnon blanc	Caryophyllaceae	2	2	1	1,67
<i>E. cyparissias</i>	Euphorbe petit-cyprès	Euphorbiaceae	1	-	-	0,33
<i>P. lanceolata</i>	Plantain lancéolé	Plantaginaceae	2	1	-	1,00
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	1	0	2	1,00
<i>C. arvensis</i>	Liseron des champs	Convolvulaceae	1	-	0	0,33
<i>E. arvense</i>	Prêle des champs	Equisetaceae	1	-	1	0,67
<i>L. repens</i>	Linaire rampante	Scrophulariaceae	2	2	1	1,67
<i>C. scoparius</i>	Genêt à balai	Fabaceae	1	1	1	1,00
<i>D. carotta</i>	Carotte sauvage	Apiaceae	1	-	0	0,33
<i>S. vulgaris</i>	Silène enflé	Caryophyllaceae	-	0	1	0,33
Nbre esp / m²			13	10	13	12,00

Valorisation scientifique des travaux

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Austruy, A., Wanat, N., Moussard, C., Vernay, P., Baudu, M., Ledoigt, G., Hitmi, A. *Impact on the growth, photosynthetic activities, uptake and accumulation of arsenic by three plant species, Solanum nigrum, Agrostis tenuis and Vicia faba cultivated on polluted soil.* Accepter après correction par Chemosphere, mai 2012.

Ollivier, J., Wanat, N., **Austruy, A.**, Hitmi, A., Joussein, E., Welzl, G., Munch, J.C., Schlöter, M. *Abundance and diversity of ammonia oxidizing prokaryotes in the root-rhizosphere complex of Miscanthus x giganteus grown in heavy metal contaminated soils.* Accepté après correction.

Wanat, N., **Austruy, A.**, Joussein, E., Soubrand, M., Hitmi, A., Gauthier-Moussard, C., Vernay, P., Munch, J.C., Pichon, M. *Potential use of miscanthus x giganteus on highly contaminated Technosols: physiological response and adaptability.* Soumis à Chemosphere.

Vernay, P., **Austruy, A.**, Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., 2009. *Seed germination and photosynthesis of plants as bioindicators of soil pollution*, Etude et Gestion des Sols, vol. 16 (3/4), p. 349-357.

PARTICIPATIONS A DES CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

Communication orale

Austruy, A. *Tolerance and detoxification mechanisms of arsenic in plants: role of antioxidant enzymes.* COST Action FA0905: Mineral-improved crop production for healthy food and feed, Ela Quality Resort, Antalya-Belek, Turkey, 1-5 November 2010.

Communication par affiches

Austruy, A., Villain, M., Vernay, P., Moussard-Gauthier, C., Hitmi, A. *In-situ Phytostabilisation of Metals and Metalloids in a contaminated Industrial Site.* ICOBTE 2011, Firenze, Italie, 3-7 juillet 2011.

Wanat, N., **Austruy, A., Hitmi, A., Joussein, E., Munch, J.C.** *The adaptation of Miscanthus x giganteus plant to soils developed from mining wastes.* EGU general assembly 2011, Vienna, Autriche, 3-8 avril 2011.

Austruy, A., Camares, O., Sicard, Q., Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A. *Evaluation of the soil toxicity before and after culture of Cannabis sativa L. using standardized ecotoxicological bioassays.* COST Action FA0905: Mineral-improved crop production for healthy food and feed, Ela Quality Resort, Antalya-Belek, Turquie, 1-5 novembre 2010

Austruy, A., Moussard, C., Vernay, P., Goupil, P., Ledoigt, G., Hitmi, A. *Effects of arsenic on lipid peroxidation and physiological activities in plants species.*
COST 859, International Workshop on “Uptake, sequestration and detoxification – An integrated approach” University of Szeged, Hungary, 15-17 avril 2009.

Austruy, A., Vernay, P., Moussard, C., Hitmi, A. *Assimilation of Arsenic by plants and physiological impact : Study on Agrostis tenuis, Holcus lanatus and Solanum nigrum - In the context of phytorehabilitation.*

Université d'été de Limoges – ENSIL « Décontamination des eaux et des sols : vers de nouveaux procédés intégrés de dépollution » du 25 au 29 août 2008.